



Facultad de Medicina
Programa de Magíster en Ciencias Médicas
Mención Biología Celular y Molecular

**“Eficacia protectora de una vacuna intranasal contra
Streptococcus pyogenes evaluada en un modelo murino”**

Enrique Alfonso Geoffroy Caldera

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión de la Directora de Tesis Aniela Wozniak en el laboratorio de Microbiología de la Red de Salud UC CHRISTUS, aprobado por los miembros de la Comisión.

Dra. Aniela Wozniak
Directora de Tesis

Dra. Patricia García
Co-Directora de Tesis

Dra. Jenny Llanos
Comisión Evaluación Tesis

Dra. Verónica Rojas
Comisión Evaluación Tesis

Dr. Rodrigo Vergara
Comisión Evaluación Tesis

**Valparaíso, Chile
2015**

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi familia, en especial a mi madre Verónica por su constante apoyo para perseguir este sueño que marca una etapa importante en mi vida. Además, a cada uno de mis amigos y amigas, por acompañarme en cada uno de los momentos que los necesite, y por alentarme a seguir adelante durante este largo camino recorrido.

Agradecimientos

A los integrantes del Laboratorio de Microbiología de la Red de Salud UC CHRISTUS, les agradezco por su colaboración en la realización de este trabajo, en especial a mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Molecular: Claudia Castillo, Carolina Miranda, Andrea Vera, Francia Sanhueza, Samantha González y Daniel Aguirre por su disponibilidad y comprensión en el periodo durante el cual se realizó esta tesis.

Agradezco a mi tutora, la Dra. Aniela Wozniak por permitir mi participación como alumno tesista en su proyecto de investigación, el cual me entrego múltiples herramientas que fueron, son y serán piezas importantes para mi desarrollo profesional. Además, agradecer su orientación, disponibilidad y amabilidad para analizar y resolver las interrogantes originadas durante la realización de este proyecto.

A mi jefatura, la Dra. Patricia García y TM Juan Carlos Román les doy las gracias por las facilidades entregadas para la realización de la totalidad de las actividades relacionadas con el desarrollo del Magister.

Agradezco a Francisco Salazar-Echegarai (Departamento de Genética Molecular y Microbiología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile), por su ayuda y colaboración en el manejo, cuidado y procesamiento de los ratones utilizados como modelo de experimentación, además de su asesoría en la captura de las fotografías utilizadas para la determinación de daño pulmonar.

Este trabajo fue financiado por el Proyecto FONDECYT Inicio N° 11110036 (Investigador Responsable Aniela Wozniak) y por Fondos del Departamento de Laboratorios Clínicos de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Índice de materias

Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
Índice de materias	5
Índice de figuras	7
Índice de tablas	8
Resumen	9
Abstract	10
Introducción	11
Enfermedades causadas por <i>S. pyogenes</i>	11
Morbilidad y mortalidad asociadas a <i>S. pyogenes</i>	13
Determinantes de virulencia y mecanismos patogénicos de <i>S. pyogenes</i>	16
<i>S. pyogenes</i> y sus interacciones con el sistema inmune	20
Desarrollo de una vacuna contra <i>S. pyogenes</i>	26
Hipótesis	30
Objetivos	31
Objetivo general	31
Objetivos específicos	31
Materiales y Métodos	32
Grupos de experimentación	32
Protocolo de inmunización	33
Protocolo de desafío	34
Análisis estadísticos	35
Resultados	36
1. Título de anticuerpos IgG generados por la inmunización	36
1.1 Título de anticuerpos anti-M9 específicos en suero de ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> -M9, <i>L. lactis</i> -WT y ratones no inmunizados	36
2. Temperatura y peso corporal de los ratones desafiados con <i>S. pyogenes</i>	37
2.1 Temperatura corporal en ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> -M4	38
2.2 Temperatura corporal en ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> -M9	39
2.3 Temperatura corporal en ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> -M12	39
2.4 Peso corporal en ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> -M4	40

2.5	Peso corporal en ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> -M9.....	43
2.6	Peso corporal en ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> -M12.....	44
3.	Unidades formadoras de colonias (UFC) de <i>S. pyogenes</i> en lavados bucales.....	45
3.1	Unidades formadoras de colonias en ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> -M9	45
4.	Daño pulmonar evaluado en ratones desafiados con <i>S. pyogenes</i>	46
4.1	Daño pulmonar en ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> -M4	47
4.2	Daño pulmonar en ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> -M9	49
4.3	Daño pulmonar en ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> -M12	51
	Discusión	53
	Conclusión	56
	Referencias Bibliográficas	57

Índice de figuras

Figura 1: Modelo estructural propuesto para la proteína M6 de <i>S.pyogenes</i>	17
Figura 2: Factores de virulencia expresados por <i>S. pyogenes</i> y mecanismos mediante los cuales frustran la respuesta inmune innata del hospedero	21
Figura 3: Modelo esquemático de la proteína M en el cual se indica la región recoincida por los anticuerpos opsonizantes	22
Figura 4: Reconocimiento inmune de <i>S. pyogenes</i>	23
Figura 5: Adhesión estreptocócica e inhibición del fenómeno de adhesión en mucosa por anticuerpos específicos contra <i>S. pyogenes</i>	24
Figura 6: Esquema de la proteína M donde se representan las distintas regiones que poseen epítopes que podrían tener reacción cruzada con proteínas humanas	28
Figura 7: Título de anticuerpos anti-M9 medidos en suero proveniente de ratones inmunizados con <i>L. lactis</i> -M9, <i>L. lactis</i> -WT y no inmunizados	37
Figura 8: Temperatura corporal medida a las 18 horas post-desafío (<i>L.lactis</i> -M4)	38
Figura 9: Temperatura corporal medida a las 18 horas post-desafío (<i>L.lactis</i> -M9)	39
Figura 10: Temperatura corporal medida a las 18 horas post-desafío (<i>L.lactis</i> -M12)	40
Figura 11: Peso corporal durante los 6 días post-desafío (<i>L.lactis</i> -M4)	41
Figura 12: Peso corporal medido día a día una vez realizado el desafío (<i>L.lactis</i> -M4)	42
Figura 13: Peso corporal medido durante los 6 días post-desafío (<i>L.lactis</i> -M9)	43
Figura 14: Peso corporal medido durante los 6 días post-desafío (<i>L.lactis</i> -M12)	44
Figura 15: UFC de <i>S. pyogenes</i> en ratones inmunizados con <i>L.lactis</i> -M9, <i>L. lactis</i> -WT, no inmunizados y sanos	46
Figura 16: Puntajes de daño pulmonar en ratones inmunizados con <i>L.lactis</i> -M4	47
Figura 17: Micrografías de cortes histológicos en ratones inmunizados con <i>L.lactis</i> -M4	48
Figura 18: Puntaje de daño pulmonar en ratones inmunizados con <i>L.lactis</i> -M9	49
Figura 19: Micrografías de cortes histológicos en ratones inmunizados con <i>L.lactis</i> -M9	50
Figura 20: Puntaje de daño pulmonar en ratones inmunizados con <i>L.lactis</i> -M12	51
Figura 21: Micrografías de cortes histológicos en ratones inmunizados con <i>L.lactis</i> -M12	52

Índice de tablas

Tabla N° 1: Péptidos utilizados para ELISA	33
--	----

Resumen

Streptococcus pyogenes es un microorganismo exclusivo del ser humano, el cual produce una variedad de infecciones clasificadas como enfermedades estreptocócicas supurativas y no supurativas. Es considerada como una de las bacterias más importantes que afectan al ser humano, ocupando el noveno lugar dentro de las causas infecciosas de muerte a nivel mundial. Actualmente no se encuentra disponible una vacuna que permita prevenir y evitar la propagación de este patógeno. Uno de los inmunógenos más atractivos para el desarrollo de una vacuna es la región hipervariable de la proteína M estreptocócica, que induce la generación de anticuerpos protectores con una gran actividad bactericida, por lo que son esenciales para la eliminación eficaz de *S. pyogenes*. Hemos desarrollado 3 cepas vaccinales que expresan péptidos hipervariable de la proteína M de 3 tipos prevalentes en la población chilena denominadas como *L. lactis*-M4, *L. lactis*-M9 y *L. lactis*-M12. Estas cepas vaccinales están basadas en *Lactococcus lactis*, un vector bacteriano de calidad alimentaria que no porta resistencia a antibióticos. El objetivo de este trabajo, fue evaluar individualmente la eficacia protectora de las tres vacunas. Para esto, se realizaron experimentos independientes de inmunización y desafío por vía intranasal en un modelo de ratones BALB/c, evaluando la capacidad inmunogénica y protectora de cada una de las vacunas mediante el análisis del título de anticuerpos, medición de temperatura y peso corporal, conteo de unidades formadoras de colonias y determinación del daño pulmonar. Los resultados indicaron que las vacunas *L. lactis*-M4, *L. lactis*-M9 y *L. lactis*-M12 son eficaces, ya que protegieron a los ratones frente al desafío con *S. pyogenes*: los ratones inmunizados no sufrieron una disminución de peso ni temperatura significativos y no mostraron daño histológico en sus pulmones. Además los ratones inmunizados con *L. lactis*-M9 produjeron anticuerpos específicos anti-M9. Esta es una nueva aproximación en el diseño de una vacuna multivalente que puede ser fácilmente administrada y producida a bajo costo en base a los datos epidemiológicos de la región donde pretende ser aplicada. Los resultados de este trabajo en un futuro permitirán contribuir de manera efectiva a solucionar este importante problema de salud pública que afecta a la población de nuestro país y del resto del mundo.

Abstract

Streptococcus pyogenes is an exclusive human pathogen, which produces a variety of infections classified as suppurative and non-suppurative diseases. It is considered one of the most important bacteria that affect humans, ranking ninth in infectious causes of death worldwide. Currently a vaccine to prevent and avoid the spread of this pathogen is not available. One of the most attractive immunogens for developing a vaccine is the hypervariable region of streptococcal M protein, which induces the generation of protective antibodies with strong bactericidal activity, which is essential for the efficient clearance of *S. pyogenes*. We have developed 3 vaccine strains expressing hypervariable M protein peptides of 3 prevalent types in the Chilean population. They are referred to as *L. lactis*-M4, *L. lactis*-M9 and *L. lactis*-M12. Vaccine strains are based on *Lactococcus lactis*, a food-grade bacterial vector which does not bear antibiotic resistances. The aim of this study was to individually evaluate the protective efficacy of the three vaccines. For this, separate immunization and challenge experiments were performed intranasally in a BALB/c mice model through evaluating the immunogenic and protective capacity of each of the vaccines through the antibody titer analysis, measurement of body weight and temperature, CFU count in oropharyngeal washes and lung damage. The results indicated that *L. lactis*-M4, *L. lactis*-M9 and *L. lactis*-M12 vaccines are effective because they protected mice against challenge with *S. pyogenes*: immunized mice did not suffer a decrease in body weight or temperature and showed no significant histological damage to their lungs. Moreover, mice immunized with *L. lactis*-M9 produced M9-specific antibodies. This is a new approach to design a multivalent vaccine that can be easily administered and produced at low cost based on epidemiological data of the region which is intended to apply. In the future the results of this work will contribute effectively to address this important public health problem that affects the population of our country and around the world.

Introducción

Streptococcus pyogenes (Estreptococo Grupo A) es una cocácea Gram positiva (0.6 – 2.0 µM de diámetro), que normalmente se dispone en pares y cadenas. Es una bacteria no móvil, no formadora de esporas, catalasa negativa y anaerobia facultativa. Se considera un microorganismo nutricionalmente fastidioso, por lo que necesita medios de cultivos enriquecidos, principalmente suplementados con sangre y suero para un desarrollo óptimo (1, 2).

Enfermedades causadas por *S. pyogenes*

Este microorganismo es un patógeno exclusivo del ser humano (3), transmitido de persona a persona por diseminación de gotitas respiratorias, a través de heridas de la piel después del contacto directo con un individuo infectado, o por medio de fómites contaminados (2, 4). Es responsable de una variedad de infecciones, que son clasificadas como enfermedades estreptocócicas supurativas y no supurativas. Con respecto a las enfermedades supurativas, *S. pyogenes* produce infecciones de mediana y alta complejidad que afectan las membranas mucosas, amígdalas, piel y tejidos profundos. Dentro de estas se encuentran la faringitis, escarlatina, pioderma, erisipela, celulitis, fascitis necrotizante y síndrome del shock tóxico estreptocócico (2, 4, 5). *S. pyogenes* es la causa bacteriana más común de faringitis, afectando principalmente a niños (5-15 años) (2, 4, 5), con un *peak* de incidencia durante los primeros 5 años de edad escolar (4). Personas de todas las edades son susceptibles a la propagación del patógeno bajo condiciones de hacinamiento, como ocurre en las escuelas e instalaciones militares (4, 5), afectando por igual a hombres y mujeres (4). Se ha descrito un aumento en el número de casos principalmente en otoño e invierno (4, 5). *S. pyogenes* habitualmente coloniza la garganta de personas asintomáticas, con tasas de portación faríngea que van entre el 15% y 20% en población escolar normal, siendo considerablemente menor en adultos (4). La fascitis necrotizante es una infección de los tejidos subcutáneos profundos y las fascias, lo que provoca la destrucción de los músculos y tejido adiposo. Se caracteriza por una rápida y amplia propagación de necrosis y gangrena de la piel y estructuras subyacentes, en conjunto con síntomas sistémicos. La toxicidad sistémica, insuficiencia multiorgánica y muerte son características de esta enfermedad. Esta infección puede ocurrir en individuos que presentan algún tipo de lesión leve en la piel, incluso a veces inaparente, o en

pacientes que presentan alguna quemadura o incisión operatoria (2, 4). El síndrome del shock tóxico estreptocócico, se describe como cualquier infección estreptocócica asociada con el inicio repentino de shock e insuficiencia orgánica. Los pacientes presentan inflamación de tejidos blandos y dolor en el sitio de infección, acompañado de síntomas inespecíficos. Este dolor aumenta a medida que la enfermedad avanza hasta causar shock e insuficiencia multiorgánica, afectando al riñón, pulmones, hígado y corazón (2, 4). Los casos de bacteriemia causados por *S. pyogenes* son relativamente raros en la era de los antibióticos, sin embargo, durante la década pasada el reporte de casos ha ido en aumento, lo que se debe a un cambio en la epidemiología y en los patrones clínicos de enfermedad invasora estreptocócica. Los individuos que cursan con infecciones localizadas, como faringitis, pioderma y erisipela, rara vez cursan con bacteriemia. Sin embargo, casi todos los pacientes con fascitis necrotizante y síndrome del shock tóxico estreptocócico tienen hemocultivos positivos, con tasas de mortalidad que van aproximadamente hasta el 40% (2, 4). La fascitis necrotizante, el síndrome del shock tóxico estreptocócico y la bacteriemia son considerados como enfermedades estreptocócicas invasoras, las que comparten características comunes, como son los factores predisponentes (que permiten la entrada de este microorganismo hasta los tejidos subcutáneos profundos y órganos) y los signos de enfermedad, como el shock y falla multiorgánica (5).

Con respecto a las enfermedades no supurativas, las infecciones por *S. pyogenes* pueden dar lugar a secuelas post estreptocócicas, que corresponden a cuadros mediados por autoinmunidad, que se originan de 1-3 semanas después de haber cursado con un cuadro agudo de enfermedad estreptocócica. Estas secuelas corresponden a la fiebre reumática y a la glomerulonefritis aguda (6, 7). La fiebre reumática es frecuente en niños de 5-15 años de edad, ocurriendo solo un 5% de los casos en niños menores de 5 años (7), y se encuentra asociada a los cuadros de faringitis estreptocócica, pero no con aquellos derivados de infecciones cutáneas. Esta enfermedad se manifiesta con la aparición de alteraciones inflamatorias que pueden afectar el corazón, las articulaciones, el sistema nervioso central, la piel y tejidos subcutáneos. Se pueden producir lesiones crónicas de las válvulas cardíacas, que al progresar conducen a una insuficiencia cardíaca grave, incapacidad y muerte muchos años después de haber cursado con la etapa aguda de la enfermedad. Se considera como la mayor causa de cardiopatía adquirida en niños de todo el mundo, siendo más común en países subdesarrollados (2, 5, 7).

La glomerulonefritis aguda ocurre principalmente en niños y adultos jóvenes, siendo afectados los hombres dos veces más que las mujeres, incluso en individuos sobre los 40 años de edad (5). Esta patología se encuentra relacionada con cuadros faríngeos y también aquellos que afectan a la piel. Clínicamente se caracteriza por la inflamación aguda de los glomérulos renales, lo que produce edema, hipertensión, hematuria y proteinuria. Los pacientes jóvenes habitualmente se recuperan sin complicaciones, pero en los adultos no se ha definido de manera apropiada el pronóstico a largo plazo. Además, se han observado pérdidas progresivas e irreversibles de la función renal (2, 7).

Morbilidad y mortalidad asociadas a *S. pyogenes*

Debido a la amplia variedad de patologías que origina *S. pyogenes*, se considera como una de las bacterias patógenas más importantes que afectan al ser humano (4), ocupando el noveno lugar dentro de las causas infecciosas de muerte a nivel mundial (8). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, en el año 2005 se estimó que anualmente se originan alrededor del mundo 616 millones de casos nuevos de faringitis, y que 18,1 millones de personas hasta esa fecha sufrían alguna enfermedad grave por *S. pyogenes*, lo que incluye las enfermedades supurativas invasoras y enfermedades no supurativas. Además, se estimó que 1,78 millones de casos nuevos de enfermedad grave ocurren cada año, siendo responsable de 517 mil muertes anualmente. Al analizar las cifras de casos y muertes, los más importantes y representativos son: 663 mil casos de enfermedades invasoras (163 mil muertes), 472 mil casos de glomerulonefritis aguda (5 mil muertes) y 470 mil casos de fiebre reumática (233 mil muertes). Si se agrupa la información según el nivel de desarrollo socioeconómico, se observa que existe una diferencia significativa en la proporción de casos en los países menos desarrollados, llegando a ser en enfermedades como la faringitis, enfermedades invasoras y glomerulonefritis aguda, entre 8, 21 y 28 veces mayor respectivamente (8-10).

En los últimos años, se han publicado artículos que permiten hacer una aproximación de la situación que se vive en nuestro país con respecto a las infecciones causadas por *S. pyogenes*. Un estudio retrospectivo realizado por Muñoz & cols entre los años 2002 y 2003 (11), analizó dos poblaciones pediátricas provenientes de distintos centros, con el objetivo de establecer la tasa de

detección de este patógeno como agente causal de faringitis. Los resultados obtenidos, indicaron que la tasa global de detección de *S. pyogenes* fue de un 37%, existiendo una mayor tasa de positividad (50%) entre los 6 y 10 años de edad.

Con la finalidad de caracterizar el cuadro epidemiológico y clínico de la glomerulonefritis aguda, se realizó un estudio prospectivo en un servicio local de salud en Chile entre los años 1980 y 1999. La incidencia de casos mostró que el periodo entre 1980-1983 fue designado como periodo endémico, entre 1984-1989 se consideró como periodo epidémico, y entre 1990-1999 se denominó como periodo tardío, con una tasa por cada 100.000 habitantes de 6,2, 13,2 y 1,7, respectivamente. La tasa anual disminuyó gradualmente de 13,2 en el periodo epidémico a 0.0 en 1999, tasa que es similar a la que presentan los países industrializados (12).

La notificación de las enfermedades invasoras por *S. pyogenes* es obligatoria en Chile (Reglamento sobre Notificación de Enfermedades Transmisibles de Declaración Obligatoria DTO. N° 158/04). En base a esto, en el año 1995 se notificaron 138 casos de enfermedad invasora por *S. pyogenes*, con una letalidad global de un 28,2%, siendo los valores más altos registrados por los cuadros de shock séptico (60%). Las tasas de enfermedad invasora fluctuaron entre un 0,16 y 2,0 por cada 100.000 habitantes. Entre los años 1997 y 1998 se observó una disminución en el número de infecciones invasoras, con un promedio de 2,6 casos mensuales. Pero en 1999, solamente durante el mes de Enero, fueron registrados 22 casos de infección severa, alcanzando una tasa de letalidad del 41%, llegando a completar 86 casos durante el año. Entre los meses de Enero y Abril del año 2000, fueron comunicados 10 casos de enfermedad invasora (13). Datos más actuales, indican que en el periodo comprendido entre Enero de 2009 y Junio de 2013 se confirmaron 346 cepas invasoras de *S. pyogenes*. Los grupos de edad más frecuentes en las cepas confirmadas, fueron los que corresponden a los rangos etarios de 1-15 años (38,4%), y de 60 o más años (19,4%). De las cepas confirmadas como agente causal de enfermedad invasora, el 84,7% provenía de muestras de sangre, siguiendo en frecuencia las muestras de líquido articular (7,3%) y líquido pleural (4,0%) (14).

Dado que las infecciones causadas por este patógeno deben ser tratadas, la resistencia antibiótica es un punto importante que debe ser considerado, ya que la terapia antimicrobiana cumple con los siguientes objetivos: 1) prevenir los casos de fiebre reumática, 2) prevenir las complicaciones supurativas, 3) mejorar los síntomas y signos clínicos, y 4) rápidamente disminuir la

infectividad para reducir la transmisión a los miembros de la familia, compañeros de curso o de trabajo, y otros contactos cercanos, además de permitir la rápida incorporación a las actividades habituales. La penicilina (antibiótico perteneciente a la clase de los betalactámicos), es la droga de elección en el tratamiento por infecciones estreptocócicas, debido a su eficacia, seguridad, espectro reducido, y su bajo costo (4).

Debido a que existen pacientes que pueden presentar reacciones adversas a los betalactámicos, son necesarias otras alternativas terapéuticas, por lo que la eritromicina (antibiótico de la clase de los macrólidos) es considerada como el antibiótico de segunda línea en la prevención de la fiebre reumática (15), y la clindamicina (antibiótico de la clase de las lincosamidas) es utilizada como monoterapia en las infecciones invasoras (10). *S. pyogenes* sigue siendo totalmente sensible a la penicilina, a pesar de más de cinco décadas de exposición, sin embargo, este microorganismo desarrolló rápidamente resistencia contra los macrólidos y lincosamidas (10). De acuerdo al boletín emitido por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) el año 2013 (notificación de las enfermedades invasoras por *S. pyogenes*), los resultados de susceptibilidad antimicrobiana indicaron que *S. pyogenes* aún es susceptible a la penicilina en un 100% de los casos aislados, y la resistencia asociada a eritromicina y clindamicina sigue siendo baja (sensibilidad de 93%-99% y 98%-100% respectivamente) (14). Esto se podría deber a que en Chile en el año 1999 el Ministerio de Salud (MINSAL), implementó una medida regulatoria que restringe la venta de antibióticos, buscando disminuir el uso indiscriminado de estos (16).

Estos datos indican que las infecciones por *S. pyogenes* siguen siendo un problema de salud que afecta constantemente a la población de nuestro país y al resto del mundo, por lo que el estudio y vigilancia permanente de la resistencia antibiótica en este patógeno es de real importancia, ya que en un futuro permitirá tomar las medidas preventivas en forma oportuna (14).

Determinantes de virulencia y mecanismos patogénicos de *S. pyogenes*

Streptococcus pyogenes ha sido objeto de investigación durante más de un siglo, pero dentro de los últimos años gracias a la utilización de técnicas de biología molecular (17), se han logrado avances significativos en la comprensión de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la patogénesis (18). Se han caracterizado un gran número de determinantes de virulencia, los que exhiben principalmente una redundancia funcional en los procesos de adhesión, colonización, invasión, y resistencia a la inmunidad innata (18).

Para que *S. pyogenes* pueda desencadenar algún tipo de enfermedad en el ser humano, primero debe adherirse a las células del epitelio faríngeo o dérmico. Sin mecanismos que contribuyan al desarrollo de una fuerte adhesión, el microorganismo será removido por acción de fuerzas mecánicas y electrostáticas, impidiendo de esta manera la supervivencia del microorganismo al momento de competir contra algunas poblaciones de la flora normal por los sitios de unión. Por lo tanto, se considera a la adhesión como el paso inicial más importante en la colonización del hospedero (5, 17). El modelo propuesto que permite comprender este fenómeno, describe un proceso que es desarrollado en dos etapas. Inicialmente, se establecen interacciones débiles y/o de largo alcance con la mucosa, permitiendo que ocurra una segunda etapa de adherencia que involucra múltiples eventos de unión, confiriendo una mayor especificidad y avidéz por el tejido (5, 18). *S. pyogenes* expresa en su superficie unos componentes celulares específicos denominados adhesinas, que son las encargadas de mediar su adhesión, reconociendo y uniéndose a diversos componentes de la matriz extracelular en los tejidos anfitriones (18, 19), facilitando de esta manera no sólo la colonización, sino también la invasión (19). Estudios realizados en cultivos celulares y animales de experimentación, han logrado identificar un número considerable de adhesinas involucradas en este proceso, siendo el ácido lipoteicoico (LTA), la proteína M, y las proteínas de unión a fibronectina las más importantes y extensamente estudiadas. Anticuerpos dirigidos contra LTA dan como resultado un bloqueo en la adhesión, al igual que la adición de LTA a los cultivos, que genera una saturación de su receptor (fibronectina), obteniendo como resultado la inhibición del fenómeno. Para poder actuar como adhesina, el LTA debe formar un complejo con la proteína M, lo que permite su estabilización, y orientación de su porción lipídica hacia el exterior, estableciendo interacciones hidrofóbicas con sitios de unión a ácidos grasos presentes en la fibronectina y células

epiteliales (5, 17, 20). Las proteínas de unión a fibronectina permiten que *S. pyogenes* establezca contacto con distintos sitios anatómicos, como son el tracto respiratorio y la piel (5, 18).

La proteína M, es uno de los principales factores de virulencia que posee *S. pyogenes*. Es codificada por el gen *emm*, y el estudio del mismo, mediante técnicas de secuenciación y clonamiento, han permitido entender en detalle su estructura y las funciones esenciales que cumple esta proteína (5). Es una macromolécula fibrilar, compuesta por dos cadenas polipeptídicas de configuración α -helicoidal, formadas (desde el extremo N-terminal) por un péptido señal conservado, seguido por cuatro bloques de repeticiones (designados con las letras A, B, C y D), y una región de anclaje a membrana (altamente conservada) presente en el extremo C-terminal (17, 20).

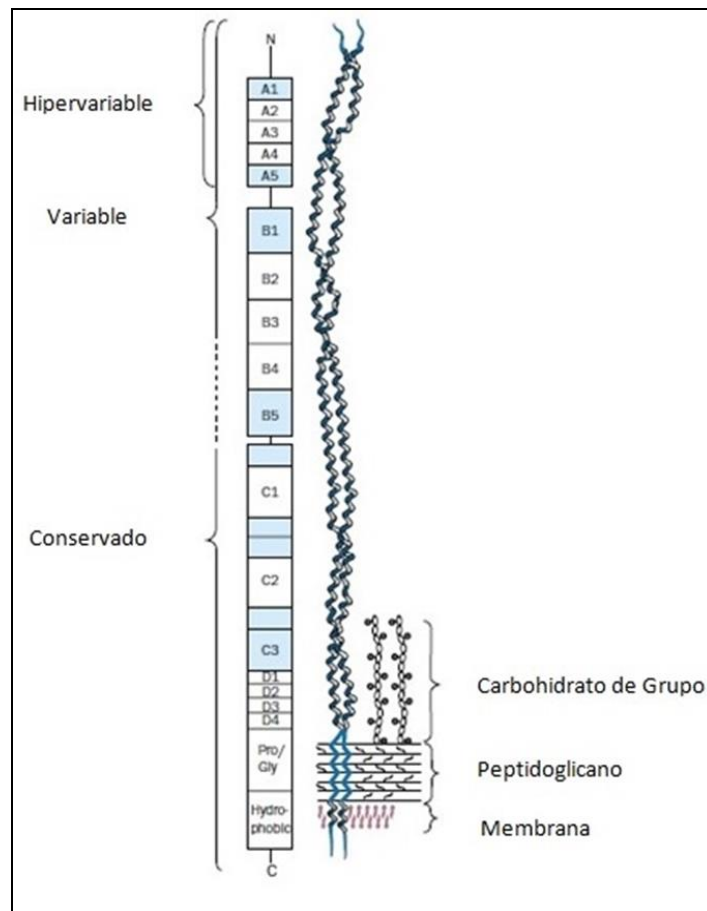


Figura 1: Modelo estructural propuesto para la proteína M6 de *S.pyogenes*. La doble cadena alfa-helicoidal se encuentra anclada a la membrana plasmática a través de su extremo C-terminal, y se extiende 50 nm sobre la pared bacteriana, donde se pueden distinguir las regiones de repetición D, C, B y A. En su extremo N-terminal, la proteína finaliza una región no-helicoidal que constituye el péptido señal (17, 21).

Si se toma como modelo estructural la proteína M6 de *S. pyogenes* (**Figura N° 1**), se puede observar que la porción N-terminal se proyecta hacia el medio extracelular (17). Las regiones A, B, C y D se diferencian entre sí por su tamaño y secuencia aminoacídica. La región A se encuentra formada por 5 repeticiones de 14 aminoácidos, dentro de la cual las 3 repeticiones centrales son idénticas, y las de los extremos divergen levemente respecto al consenso establecido por las repeticiones centrales. La secuencia de la región A es hipervariable y la secuenciación de la misma permite la genotipificación de las cepas respecto al tipo *emm*. Si bien no existe un consenso con respecto al número de variantes existentes, algunos estudios indican que podrían existir entre 180 y 250 tipos *emm* distintos (20, 22, 23). La región B se compone de 4 repeticiones de 25 residuos, que se disponen de igual manera que la región A. La región C se constituye por 2.5 repeticiones de 42 aminoácidos, que no son similares entre sí; y la región D se encuentra formada por 4 repeticiones de 7 residuos, que muestran cierta homología entre su secuencia (20, 24). Estos segmentos de repetición conforman la región central y helicoidal de la proteína M, mientras que en el extremo C-terminal de la proteína (específicamente dentro de la membrana y pared celular) se encuentra la región que contiene el dominio de anclaje a membrana (24). Aunque la proteína M no interviene en la adhesión inicial de *S. pyogenes* a las células epiteliales de la orofaringe (17), es crucial al momento de tomar contacto con la piel. De acuerdo a lo publicado por Wang & cols (25), la proteína M permite que el patógeno establezca contacto con células HEp-2 en cultivos celulares, a través de su sitio de unión que se encuentra presente en la mitad del extremo N-terminal de la molécula. Además, se adhiere a los queratinocitos presentes en la piel, uniéndose específicamente la región de repetición C al receptor CD46 (proteína reguladora del complemento) (26).

S.pyogenes no es considerado generalmente como un patógeno intracelular, pero los experimentos realizados durante los últimos años han demostrado que el microorganismo es capaz de invadir y persistir dentro de las células epiteliales (17, 27), con una capacidad igual o mayor que algunos patógenos intracelulares clásicos, como *Listeria* y *Salmonella* spp (28). Al igual que en el proceso de adhesión, múltiples mecanismos se encuentran involucrados en el proceso de internalización del patógeno en la célula (17). Las proteínas de unión a fibronectina (Sfbl) y aquellas que poseen una alta afinidad por la fibronectina (proteína M), pueden utilizar las proteínas de la matriz extracelular como puentes para unirse a las integrinas $\alpha 5\beta 1$ presentes en la superficie de las células del hospedero. Estas interacciones activan vías de señalización celular que conducen a una reorganización del citoesqueleto, formando complejos focales que permiten la entrada de las

bacterias invasoras (5, 18). Otro grupo de proteínas que contribuyen con este proceso, son las proteínas de unión a plasminógeno. El plasminógeno unido a la superficie toma contacto con integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 1\beta 5$, promoviendo la internalización por una vía similar a la mediada por la unión a fibronectina (18). Por otro lado, el plasminógeno es convertido en plasmina por acción de la estreptoquinasa, activando metaloproteasas o colagenasas en la matriz extracelular, que son cruciales en el proceso de diseminación (18, 29). Además, *S. pyogenes* se encuentra cubierto por una capsula de ácido hialurónico, la cual se une al receptor CD44 (glicoproteína de unión a ácido hialurónico) presente en las células epiteliales humanas (5, 17). Esta interacción induce reordenamientos en el citoesqueleto que alteran la integridad de las uniones intercelulares, permitiendo el ingreso de este microorganismo a través del epitelio (17). La cantidad de capsula producida por la bacteria varía entre distintos aislados, asociándose a una mayor letalidad aquellas cepas altamente mucosas, mientras que las cepas acapsulares reducen de manera drástica su virulencia y capacidad de colonización (5).

***S. pyogenes* y sus interacciones con el sistema inmune**

Como se indicó anteriormente, *S. pyogenes* posee múltiples factores de virulencia que le confieren protección y resistencia frente a distintos componentes de la inmunidad innata (**Figura N° 2**) (18, 30). Las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) representan un elemento crítico en la respuesta contra este patógeno, y su eficacia depende de funciones especializadas como son la migración celular dirigida, captación bacteriana, y la producción de moléculas efectoras con capacidad bactericida (30).

Los leucocitos circulantes responden a señales quimiotácticas para dejar los vasos sanguíneos y migrar hacia el sitio de infección. Mientras estos quimioatrayentes incluyen productos provenientes de la pared celular bacteriana, los estímulos más fuertes y específicos derivan de las células del hospedero (30). Las peptidasas SpyCEP y ScpA de *S. pyogenes* degradan dos de las moléculas atrayentes más poderosas, la interleuquina-8 (IL-8) y la anafilotoxina C5a respectivamente. Esto inhibe el reclutamiento de neutrófilos y permite la supervivencia del microorganismo al impedir la fagocitosis en el sitio de infección (18, 30). Además de su capacidad fagocítica, los neutrófilos pueden capturar y matar microorganismos eficientemente en el espacio extracelular mediante la secreción de una matriz compuesta por DNA, histonas, gránulos con proteasas (como elastasa y mieloperoxidasa), y péptidos antimicrobianos, conocida como "trampas extracelulares de neutrófilos" (NETs). Este microorganismo escapa de estas trampas por la acción de una DNasa llamada estreptodornasa D o Sda1, que degrada las estructuras formadas por la cromatina (18, 29, 30). La expresión de la proteína M y la capsula de ácido hialurónico aumentan la supervivencia de *S. pyogenes* dentro de las trampas al aumentar la resistencia contra los péptidos antimicrobianos (18, 29).

El sistema del complemento es uno de los principales mecanismos efectores de la inmunidad innata y humoral. Al ser un sistema capaz de auto-amplificarse de manera eficiente, el potencial daño celular hacia el hospedero es mitigado mediante proteínas inhibitoras que regulan su actividad, dentro de las cuales se encuentran la proteína de unión a C4b (C4BP), factor H (FH) y su variante FHL-1 (factor H-like protein1). La proteína M impide el ensamblaje de C3 convertasa en la superficie bacteriana mediante la unión de C4BP a su región hipervariable, y mediante la unión de FH/ FHL-1 a su región de repetición C y/o región hipervariable. De esta manera, *S. pyogenes* puede

evadir la fagocitosis al impedir la opsonización y activación de la vía clásica y alternativa del complemento. El inhibidor estreptocócico del complemento (SIC) contribuye en la resistencia a la fagocitosis al prevenir la formación del complejo de ataque a membrana, mediante la unión e inhibición del complejo C5b67 del complemento (18, 30).

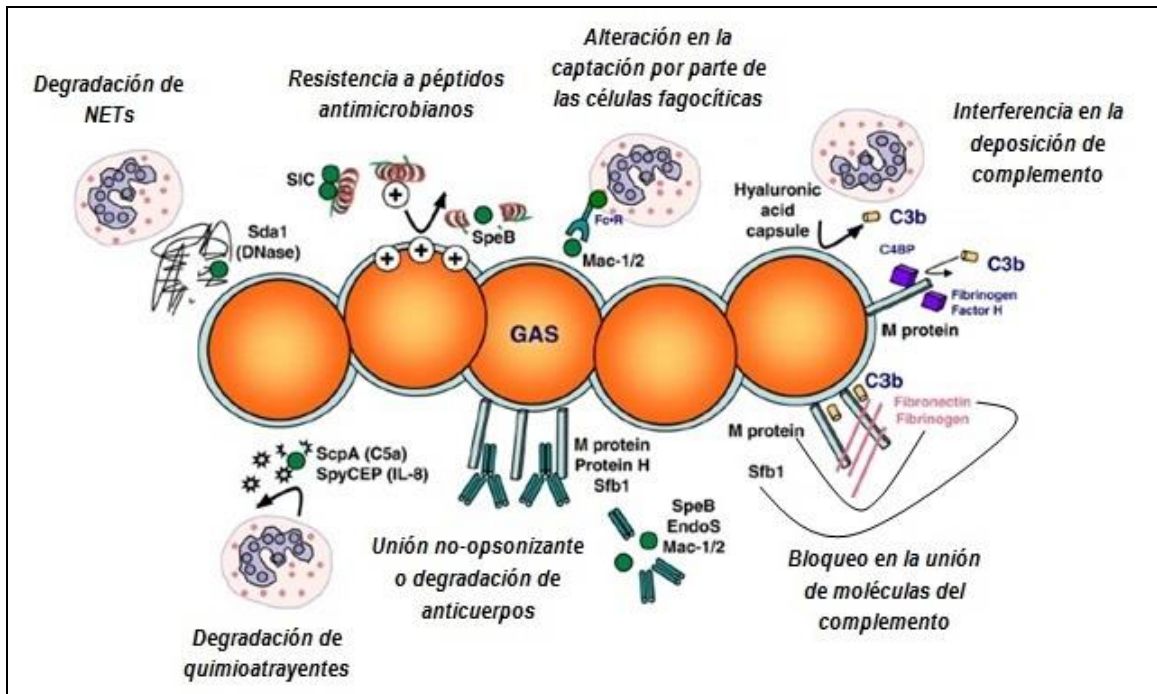


Figura 2: Factores de virulencia expresados por *S. pyogenes* y mecanismos mediante los cuales frustran la respuesta inmune innata del hospedero (18).

Una segunda forma efectiva de evitar la opsonización y posterior fagocitosis, es frustrar la función efectora de los anticuerpos mediante diversos mecanismos, como son el mimetismo molecular, proteínas de unión a inmunoglobulinas, y enzimas que degradan estas moléculas. La capsula que posee *S. pyogenes*, se encuentra compuesta por un homopolímero de ácido hialurónico idéntico al encontrado en la matriz extracelular del hospedero. Este mimetismo eficaz, le proporciona a la bacteria una capa protectora que evita su reconocimiento como antígeno extraño (30). Además, la capsula funciona como una barrera física que restringe el acceso de los fagocitos a las proteínas opsonizantes del complemento unidas en la superficie bacteriana (5, 30). Las proteínas Sfb1, proteína M y SibA cambian la orientación de los anticuerpos sobre la superficie bacteriana al unir su región Fc, adoptando de esta manera una disposición no opsonizante "hacia atrás" que evita el reconocimiento y activación de las células fagocíticas a través de sus receptores Fc. Otra vía por la

cual se puede inhibir este fenómeno, es a través de enzimas que degradan IgG, dentro de las cuales se encuentran SpeB, EndoS, Mac-1/IdeS, y Mac-2 (18, 30).

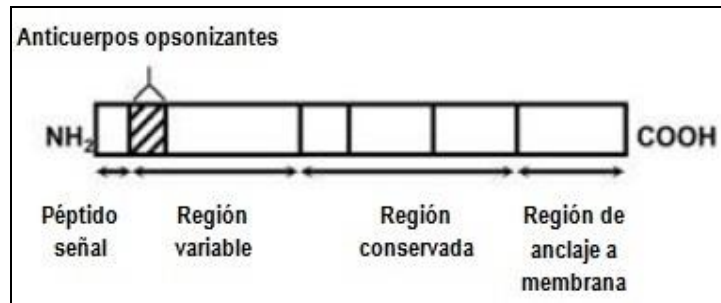


Figura 3: Modelo esquemático de la proteína M en el cual se indica la región reconocida por los anticuerpos opsonizantes (31).

Si bien *S. pyogenes* posee un comportamiento antifagocítico, el sistema inmune se sobrepone a este efecto en presencia de anticuerpos opsonizantes específicos contra la región N-terminal de la proteína M (**Figura N° 3**). Aunque durante la primera etapa de respuesta inmune se generan anticuerpos contra otras regiones de la proteína M, estos son no-opsonizantes y no confieren protección ante el patógeno. Por el contrario, una vez que el hospedero es expuesto a epítomos presentes en el extremo amino-terminal de la proteína M, se genera una respuesta primaria y la inmunidad a largo plazo es adquirida para el serotipo infectante en una etapa tardía en la infección, donde se producen anticuerpos (IgG e IgA) protectores contra este patógeno (5).

Para dilucidar el mecanismo mediante el cual estos anticuerpos inducen la fagocitosis de *S. pyogenes*, Nilsson & cols (31) utilizaron muestras de suero inmune en conjunto con un panel de anticuerpos monoclonales que bloquean la función de receptores Fc y del complemento presentes en los fagocitos. Los resultados indicaron que a pesar del bloqueo de los receptores Fc CD32, CD16 y CD89 (FcR IgA), *S. pyogenes* no pudo crecer en muestras de suero inmune, mientras que el bloqueo de CD11b/CD18 (principal receptor de C3b) si permitió el desarrollo del patógeno. Se debe tomar en cuenta que la inmunoglobulina A no fija complemento, y solo induce la fagocitosis mediante la activación de receptores Fc (CD89). Esto indica que la principal función de la inmunoglobulina G es activar la vía clásica y alternativa del complemento, ya sea al permitir la deposición de C3b sobre ellos mismos (actuando como opsoninas), así como permitir la deposición sobre la superficie bacteriana (**Figura N° 4**).

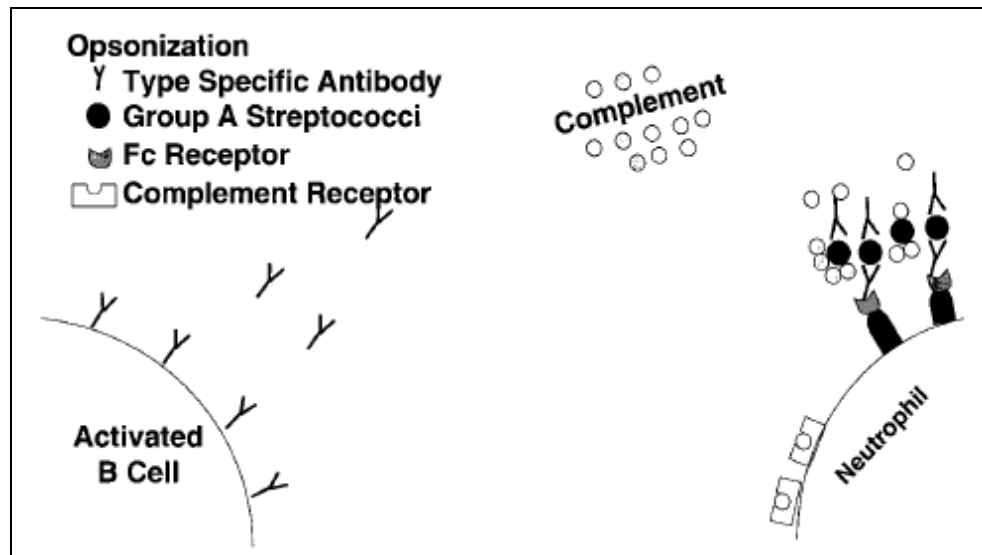


Figura 4: Reconocimiento inmune de *S. pyogenes*. Los anticuerpos tipo específicos generados contra la proteína M reconocen el microorganismo e inducen la fagocitosis, ya sea al permitir la deposición de moléculas del complemento o por activación mediante receptores Fc (5).

La inmunoglobulina A, cumple su rol protector al bloquear la adherencia de la bacteria en las superficies mucosas. De esta manera se previene la unión de *S. pyogenes* a las células epiteliales de la cavidad orofaríngea (**Figura N° 5**). Aunque la IgG no disminuye la adherencia, si bloquea el proceso de invasión e internalización de los microorganismos. Es así como la inmunidad protectora puede prevenir los fenómenos de adhesión, colonización, invasión e internalización desarrollados por *S. pyogenes* en el hospedero (5).

Si bien los mecanismos descritos anteriormente ayudan a comprender como el sistema inmune del hospedero responde ante la infección estreptocócica, la respuesta inmunológica contra *S. pyogenes* no ha sido descrita por completo. Esta falta de entendimiento puede tener consecuencias clínicas inmediatas, así como repercusiones en la comprensión de los posibles mecanismos patogénicos (32). Esto se debe principalmente, a que los modelos de experimentación utilizados tienen dificultad para adaptarse a este patógeno por ser exclusivo del ser humano. A pesar de esto, los modelos murinos han permitido estudiar adecuadamente distintos aspectos de la infección, e interacción de la bacteria con su hospedero (33). Una gran ventaja, es que estos modelos de estudio han sido manipulados y modificados genéticamente, lo que permite simular las distintas presentaciones clínicas de las infecciones en los seres humanos (34).

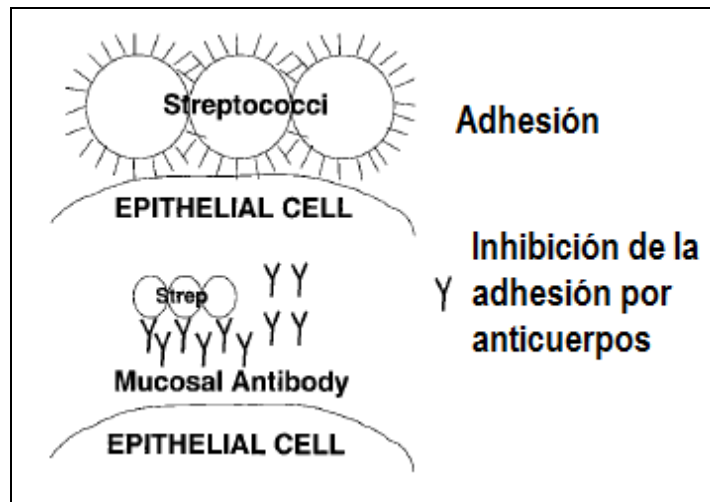


Figura 5: Adhesión estreptocócica e inhibición del fenómeno de adhesión en mucosa por anticuerpos específicos contra *S. pyogenes* (5).

Estudios epidemiológicos muestran que una misma cepa de *S. pyogenes* puede ser aislada de diferentes pacientes que presentan infecciones de diversa gravedad. Esto sugiere que existen factores propios del hospedero que determinan el curso y severidad de la enfermedad. Dentro de los más conocidos se encuentran la edad (35) y el estado inmunológico (36, 37), pero en los últimos años se ha hecho evidente que el componente genético intrínseco de cada hospedero podría contribuir en la susceptibilidad frente a este patógeno (27).

Para investigar la influencia que tiene el componente genético, en un estudio realizado por Medina & cols (38) se inocularon distintas cepas de ratones (BALB/c, DBA/2, CBA/J, y C3H/HeN) con *S. pyogenes* y se analizó el curso de la infección. De acuerdo a los tiempos de supervivencia, las cepas CBA/J y C3H/HeN fueron las más susceptibles, ya que murieron en promedio a los 3 días, mientras que DBA/2 y BALB/c mostraron una supervivencia de un 80% y 100% respectivamente, durante un periodo aproximado de 15 días. En el periodo determinado entre las 2 y 5 horas posteriores a la inoculación, se tomaron muestras de pulmón, que posteriormente fueron sembradas para determinar el crecimiento bacteriano. Los resultados indicaron, que los ratones BALB/c tuvieron una mayor capacidad para controlar el desarrollo bacteriano, antes de las 5 horas, mientras que los ratones C3H/HeN no fueron capaces de controlar este crecimiento, resultando en una progresiva multiplicación bacteriana y la muerte. La mayor resistencia a la infección por parte de los ratones

BALB/c, y la evidente susceptibilidad de la cepa C3H/HeN, indicaría que el control de la enfermedad se encuentra genéticamente determinado.

Posteriormente, Goldmann & cols (39) utilizaron modelos murinos (BALB/c y C3H/HeN), para caracterizar los mecanismos moleculares esenciales involucrados en la susceptibilidad a la infección por *S. pyogenes*. Los resultados mostraron, que ambos tipos de ratón poseen la capacidad de reclutar neutrófilos durante la infección, pero dado el mayor control por parte de la cepa BALB/c, el valor para este fue de un 3,4%, y para C3H/HeN fue de un 14%. Por otra parte, se evaluó la producción de citocinas inflamatorias TNF- α , IFN- γ , y IL-1 α , debido a que la deficiencia o exceso en su producción podría contribuir a la susceptibilidad a la infección. Los valores de IFN- γ y IL-1 α fueron significativamente más altos en C3H/HeN que en BALB/c, mientras que los valores de TNF- α no aumentaron en respuesta a la infección. Estos aumentos en los niveles de citoquinas en la cepa C3H/HeN, serían los responsables de la destrucción de tejidos, falla orgánica y muerte.

La interacción entre *S. pyogenes* y el hospedero es compleja, por lo que para entender de manera adecuada la patogénesis, se requiere la identificación y caracterización de los genes del huésped que regulan la respuesta inmune. En relación con esto, los estudios a futuro apuntan a utilizar herramientas de genómica comparativa, microarreglos, mutagenesis en ratones, y la identificación de cascadas de señalización (34).

Desarrollo de una vacuna contra *S. pyogenes*

Dado que no existen programas de prevención y tratamiento que se ejecuten efectivamente para controlar las infecciones por *S. pyogenes*, varios investigadores se encuentran trabajando actualmente en el desarrollo de una vacuna para poder combatir y reducir las altas tasas de morbilidad y mortalidad producidas por esta bacteria (9, 40).

Anualmente en Estados Unidos, se calcula que los costos asociados al total de casos de faringitis en la población pediátrica varían entre 224 y 539 millones de dólares (41, 42). Los expertos dicen, que si una vacuna tuviera eficacia intermedia, se ahorrarían anualmente con este programa de vacunación alrededor de 185 millones de dólares. Este valor fue calculado con información de 1998, por lo que hoy se estaría hablando de un monto mayor (43), y que podría ser más elevado aun si consideráramos el 100% de infecciones producidas por *S. pyogenes*. Si esto se lleva a los países menos desarrollados, los costos se elevarían de manera considerable. De acuerdo a la información descrita anteriormente, el número de casos es mucho mayor en estos países y principalmente, en las enfermedades invasoras y no supurativas, donde se encuentra el mayor número de muertes (9). Por esto, el objetivo de desarrollar una vacuna es reducir las cifras en este grupo de enfermedades (40).

La vacuna ideal debe ser segura, eficaz, práctica y económica (40). Además, el diseño debe considerar un epítipo que se encuentre presente entre todas las cepas de *S. pyogenes*, que sea altamente inmunogénico, y que confiera memoria inmunológica en ausencia de reacción cruzada con los tejidos del hospedero (44). Los posibles candidatos para desarrollar una vacuna contra *S. pyogenes* derivan de sus múltiples factores de virulencia, dentro de los cuales se encuentran la proteína M, C5a peptidasa, Spe B, SfbI y el carbohidrato específico de Grupo A (40). Dado que la proteína M es el único factor de virulencia ante el cual se generan anticuerpos opsonizantes capaces de proteger ante la enfermedad, es considerado como el mayor candidato para este propósito. La desventaja es que como los anticuerpos reconocen la región hipervariable, la inmunidad adquirida es específica para cada proteína M infectante, por lo que no funcionaría contra todos los tipos M de *S. pyogenes*, y además algunas regiones de su proteína pueden provocar secuelas autoinmunes. Es por esto que la región conservada de repetición C de la proteína M podría ser otro candidato que eliminaría estas problemáticas (40). Lamentablemente, los anticuerpos generados contra esta región

son no-opsonizantes y no protegen eficazmente ante una nueva infección en el hospedero humano (5). Estudios realizados con modelos animales, muestran que vacunas generadas a partir de C5a peptidasa (45, 46), SfbI (47), y la región C de la proteína M (48-50) generan anticuerpos protectores contra *S. pyogenes*, pero sus eficacias son cuestionadas ante la falta de evidencia que avale esto en humanos (44).

A pesar de que la proteína M podría generar algunas complicaciones al ser utilizada como modelo para el desarrollo de una vacuna, si se toman algunas consideraciones, esta región aún sigue siendo el candidato preferido para este propósito. Para esto es necesario analizar la estructura de la proteína M, y conocer la prevalencia de los distintos tipos de proteína M en la región donde se pretende utilizar la vacuna. Como se detalló anteriormente la proteína M posee 4 bloques de repeticiones, conocidos como A, B, C y D. El tipo específico de proteína M es determinado por epítomos ubicados en los primeros 40 a 50 aminoácidos del extremo N-terminal de la región A. Estos epítomos son los responsables en la generación de anticuerpos con capacidad bactericida (protectores), y rara vez generan anticuerpos que pudieran tener reacción cruzada con el hospedero (51). Por el contrario, la región B tiene una alta similitud estructural con algunas proteínas humanas como la miosina y tropomiosina, por lo que es descartada como blanco para una vacuna, ya que los pacientes podrían cursar con secuelas autoinmunes (5). No obstante, la región de repetición C debe ser utilizada con el mismo cuidado que las regiones A y B, ya que también se han identificado epítomos que podrían desencadenar algún tipo de respuesta autoinmune en el hospedero (**Figura N° 6**) (5, 40, 52).

En la actualidad, existe una vacuna 26-valente basada en la región N-terminal de la proteína M. Esta consta de 4 proteínas de fusión, que contienen 6 o 7 fragmentos en tándem derivados de la región hipervariable de los 26 tipos de proteína M más prevalentes en Estados Unidos. En su diseño, se identificaron los epítomos de interés de cada una de las proteínas M que la constituyen y la secuencia aminoacídica fue analizada para ver si no existía similitud con proteínas humanas (51). Esta vacuna ya ha superado las pruebas clínicas de tipo 1 (53) y tipo 2 (54), por lo que es considerada como segura para seguir realizando experimentos en humanos. Esto indicaría que la región hipervariable puede ser utilizada tomando esta primera precaución, pero el modelo expuesto basado en subunidades proteicas tendría un costo muy elevado de producción. Debido a que la vacuna para *S. pyogenes* buscaría llegar a países con escasos recursos, se debe buscar una manera de abaratar los costos, y esto se puede lograr utilizando vacunas recombinantes, basadas

en un microorganismo que exprese una porción de una proteína. Dicho microorganismo no debe ser considerado patógeno y no debe causar daño a quien le será administrada, como se ha realizado con *S. gordonii*, un comensal de la cavidad oral (40). En el año 2012, Wozniak & cols (55) determinaron cuales son los tipos de proteína M más prevalentes en Chile, resultando ser en orden decreciente los tipos 12, 1, 4, 28, 22, 6, 75, 2, 77, 9, 11, 94, 3, 78, 87, 48, 73, 81 y 89. Esto resolvería la segunda problemática relacionada con la variabilidad de la región amino-terminal, ya que al igual que en el trabajo descrito con la vacuna 26-valente, se pueden seleccionar las proteínas más prevalentes en nuestro país.

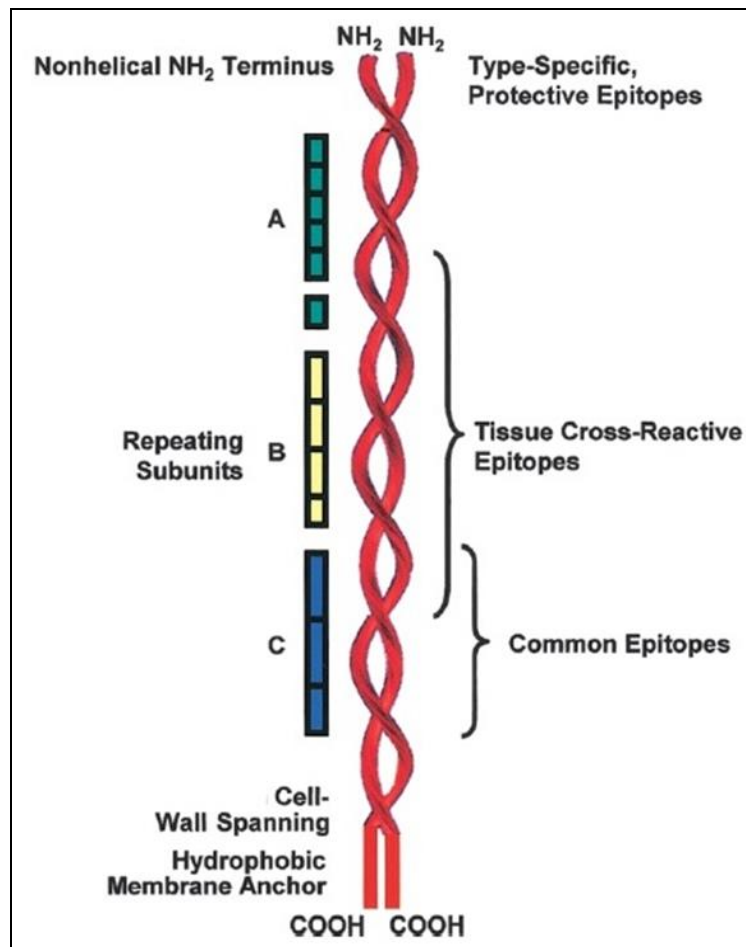


Figura 6: Esquema de la proteína M donde se representan las distintas regiones que poseen epítopes que podrían tener reacción cruzada con proteínas humanas. La región A se encuentra representada en color verde, la región B en color amarillo, y la región C en color azul (52).

En resumen, en Chile las infecciones por *Streptococcus pyogenes* siguen siendo un problema de salud importante, pero al no contar con programas de prevención eficaces, nace la necesidad (al igual que en el resto del mundo) de intentar desarrollar una vacuna basada en los tipos de proteína M más prevalentes en nuestro país, que permita contribuir a mejorar la salud de nuestra población de una manera económicamente viable.

Esta Tesis se encuentra dentro del marco del proyecto FONDECYT N° 11110036, que lleva por nombre “Development of a live bacterial vaccine against *Streptococcus pyogenes*, the causative agent of pharyngitis and necrotizing fasciitis among others, based on the most prevalent streptococcal M types in Chile”. Durante el primer año del proyecto, se logró expresar de manera individual en un vector no patógeno (*Lactococcus lactis*) péptidos de 30-50 aminoácidos seleccionados a partir de la región hipervariable de los 6 tipos de proteína M más prevalentes en la población Chilena, creando un total de 6 cepas vaccinales denominadas como *L. lactis*-M12, *L. lactis*-M1, *L. lactis*-M4, *L. lactis*-M28, *L. lactis*-M2 y *L. lactis*-M9. El criterio de selección incluyó un análisis en el que todas aquellas regiones amino-terminales que tuvieran 5 o más aminoácidos en común con alguna proteína humana fueron excluidas.

El objetivo principal del presente trabajo, fue evaluar la eficacia protectora de las vacunas *L. lactis*-M4, *L. lactis*-M9 y *L. lactis*-M12 en un modelo de ratones BALB/c. El modelo de experimentación elegido corresponde a esta cepa de ratones, debido su capacidad para sobrevivir a la infección por *S. pyogenes*. Esto permitirá evaluar adecuadamente los distintos parámetros que permitirán evaluar la eficacia de la vacuna, dentro de los que se encuentran anticuerpos, temperatura, peso, unidades formadoras de colonias y daño pulmonar (38). La inmunización fue realizada a través de la vía intranasal, ya que se ha visto que produce altos niveles de anticuerpos en suero, pero también en saliva, lo que permitiría bloquear la unión del patógeno a las células epiteliales, resultando en una primera línea de defensa contra este patógeno (56).

Hipótesis

"La inmunización intranasal de ratones BALB/c con cepas de *Lactococcus lactis* que expresan péptidos inmunogénicos de la proteína M, producen anticuerpos opsonizantes capaces de proteger a los ratones frente al posterior desafío con *Streptococcus pyogenes*"

Objetivos

Objetivo general:

- ❖ Determinar individualmente la eficacia protectora de las vacunas *L. lactis*-M4, *L. lactis*-M9, y *L. lactis*-M12 en un modelo de ratones BALB/c.

Objetivos específicos:

- ❖ Determinar la capacidad inmunogénica de la vacuna:
 - Medición del título de anticuerpos de tipo IgG producidos por el ratón en muestras de suero.
- ❖ Evaluar la capacidad protectora de la vacuna:
 - Medición de temperatura corporal post-desafío.
 - Medición de peso corporal post-desafío.
 - Conteo de unidades formadoras de colonias de *S. pyogenes* en lavados bucales post-desafío.
 - Determinación de daño pulmonar mediante análisis histopatológico.

Materiales y Métodos

Este proyecto contó con la aprobación de la Comisión de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas, y de la Comisión de Ética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

❖ Grupos de experimentación:

Para probar las vacunas *L. lactis*-M4, *L. lactis*-M9 y *L. lactis*-M12, se realizaron experimentos independientes de inmunización y desafío. En cada uno de estos experimentos, se formaron 4 grupos distintos, constituidos cada uno de ellos por 3-4 ratones hembras de 6-8 semanas de edad correspondientes a la cepa BALB/c. Para poder evaluar distintos efectos relacionados a la vacuna, cada uno de los grupos fue intervenido de manera distinta antes del desafío, y en base a esto se les colocó un nombre. El primer grupo llevó el nombre de la vacuna administrada (grupo *L. lactis*-M4, grupo *L. lactis*-M9, grupo *L. lactis*-M12). El segundo grupo, fue denominado como "grupo sano", ya que estos ratones no fueron inmunizados y tampoco desafiados. El tercer grupo, fue llamado "*L. lactis*-WT", ya que los ratones fueron inmunizados con el vector vacío para descartar el potencial rol protector de *L. lactis* por sí solo. El cuarto y último grupo, fue denominado como "no inmunizado", ya que estos ratones fueron inmunizados con PBS y posteriormente desafiados para ver el curso normal de la infección.

Durante todo el periodo de experimentación, los ratones fueron mantenidos en condiciones adecuadas de temperatura, y para asegurar una calidad adecuada de aire, se colocaron en jaulas con filtro dentro de un rack contenedor. De esta manera, evitamos que los ratones se enfermaran con microorganismos que pudieran circular en el aire de la habitación. Cuando los ratones fueron inmunizados, desafiados y sacrificados, estos fueron manipulados dentro de un gabinete de bioseguridad tipo 2.

Los experimentos realizados para *L. lactis*-M9 y *L. lactis*-M12 fueron realizados por duplicado, mientras que *L. lactis*-M4 solo se analizó por uniplicado.

❖ **Protocolo de inmunización:**

El protocolo de inmunización abarcó un periodo de 42 días. El día 0, los ratones de los grupos *L. lactis*-M4, *L. lactis*-M9 y *L. lactis*-M12 fueron inmunizados por vía intranasal con una suspensión de 50 µL de PBS que contenía 10⁹ UFC de la vacuna correspondiente. De igual manera, al grupo *L. lactis*-WT se le administró una suspensión que contenía 10⁹ UFC de *L. lactis*, y al grupo no inmunizado se le inoculó 50 µL de PBS estéril. 14 y 28 días después de esta primera inmunización, los distintos grupos recibieron inmunizaciones de refuerzo con las mismas dosis anteriormente descritas. Antes de cada una de las inmunizaciones, los ratones fueron anestesiados mediante la inyección de 100 µL de una solución de ketamina + xilacina (Solución Stock Ketamil (Agrovet) 10%; Xilacina (Centrovet) 2%), calculada según el peso corporal de los ratones (0,004 mg/g de peso de xilacina y 0,08 mg/g de peso de ketamina). Esto debido a que si los ratones se encontraban conscientes, la vacuna podría haber sido deglutida, por lo que la mezcla ketamina + xilacina posee la capacidad de inhibir el reflejo de deglución en los ratones, asegurando su entrada exclusiva por la vía respiratoria.

Para evaluar la capacidad inmunogénica de la vacuna, 14 días después de cada una de las inmunizaciones (día 14, 28 y 42) los ratones fueron anestesiados con isoflurano [Furano (Baxter)] para la obtención de muestras de sangre a partir de una vena facial superficial. La sangre recolectada fue incubada durante 1 hora a 37 °C, y posteriormente centrifugada durante 5 minutos a 5000 rpm. El suero fue transferido a un tubo limpio y se almacenó a 4 °C hasta su uso. Para medir el título de anticuerpos IgG anti-M4, anti-M9 y anti-M12 específicos, se utilizó la técnica de ELISA. Para esto se sintetizaron péptidos (Peptide 2,0, Inc, Chantilly, VA) con la misma secuencia aminoacídica de la región hipervariable que expresaban las cepas *L. lactis*-M4, *L. lactis*-M9 y *L. lactis*-M12 (**Tabla N° 1**).

- **Tabla N° 1:** Péptidos utilizados para ELISA.

Tipo de proteína M	Secuencia aminoacídica	Tamaño (aa)
M4	Ala-Glu-Ile-Lys-Lys-Pro-Gln-Ala-Asp-Ser-Ala-Trp-Asn-Trp-Pro-Lys-Glu-Tyr-Asn-Ala-Leu-Leu-Lys-Glu-Asn-Glu-Glu-Leu-Lys-Val-Glu-Arg-Glu-Lys-Tyr-Leu-Ser-Tyr-Ala-Asp-Asp-Lys-Glu-Lys-Asp-Pro-Gln-Tyr-Arg-Ala	50
M9	Glu-Gly-Val-Lys-Lys-Ala-Glu-Glu-Ala-Lys-Leu-Ser-Val-Pro-Lys-Thr-Glu-Tyr-Asp-Lys-Leu-Tyr-Asp-Asp-Tyr-Asp-Lys-Leu-Gln-Glu-Lys-Ser-Ala-Glu-Tyr-Leu-Glu-Arg-Ile-Gly-Glu-Leu-Glu-Glu-Arg-Gln	46
M12	Asp-His-Ser-Asp-Leu-Val-Ala-Glu-Lys-Gln-Arg-Leu-Glu-Asp-Leu-Gly-Gln-Lys-Phe-Glu-Arg-Leu-Lys-Gln-Arg-Ser-Glu-Leu-Tyr-Leu-Gln-Gln-Tyr-Tyr-Asp-Asn-Lys-Ser-Asn-Gly-Tyr-Lys-Gly-Asp-Trp-Tyr-Val-Gln-Gln	49

Las placas de ELISA (greiner bio-one, MICROLON HIGH BINDING) fueron sensibilizadas con 5 ng/ μ L del péptido sintético específico para el anticuerpo que se estaba analizando. Para esto, el péptido fue mezclado con buffer carbonato de sodio-bicarbonato 0,1M pH 9,6, y se agregaron 100 μ L en cada pocillo, para posteriormente ser incubados durante toda la noche a temperatura ambiente. El exceso de péptido fue removido, y los pocillos fueron lavados 5 veces con PBS-Tween 0,05%. Para eliminar señales inespecíficas, los pocillos fueron bloqueados con PBS-BSA 2% e incubados durante 1 hora a 37 °C. A continuación, los pocillos fueron lavados 3 veces con PBS, encontrándose listos para ser utilizados. El suero para ser utilizado, fue diluido inicialmente 1/100 y a partir de esta se realizaron diluciones seriadas de 1:2. Se cargaron en los pocillos 100 μ L de cada una de las diluciones realizadas, y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Los pocillos fueron lavados 3 veces con PBS-Tween 0,05%, y se agregaron 100 μ L del conjugado (anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante; Abcam) incubándose por 1 hora a 37 °C. Los pocillos fueron lavados 3 veces con PBS-Tween 0,05%, y se agregaron 100 μ L del sustrato (Tetramethylbenzidine; Thermo Scientific), incubándose por 6 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo, se agregaron 100 μ L de la solución de detención (H_2SO_4 2 M) y las placas fueron leídas. El título fue expresado como el recíproco de la dilución más alta en la cual fue positivo el ensayo, considerándose como tal todas aquellas lecturas con absorbancias de $\geq 0,1$ a 450 nm (57).

❖ Protocolo de desafío:

14 días después del segundo refuerzo inmunológico (día 42), los grupos de experimentación fueron desafiados por vía intranasal con una cepa de *S. pyogenes* que expresaba la proteína M para la cual fueron vacunados. Los ratones fueron infectados con una dosis de 2×10^8 UFC de *S. pyogenes*, que fue administrada en 50 μ L de PBS. Al igual que en la inmunización, antes de la inoculación los ratones fueron anestesiados con ketamina + xilacina. Una vez realizado el desafío, se midió la temperatura y peso corporal, en conjunto con lavados bucales con la finalidad de evaluar la capacidad protectora de la vacuna. La temperatura corporal fue medida a las 18 horas post-desafío con ayuda de un termómetro infrarrojo. El peso corporal, fue medido diariamente en una balanza hasta llegar al sexto día post-desafío. Los valores de peso y temperatura fueron medidos en triplicado para disminuir el porcentaje de error de la medición. Una vez transcurridas 24, 48 y 72 horas

posteriores al desafío, los ratones fueron anestesiados con ketamina + xilacina y se realizaron lavados bucales con 50 μ L de PBS estéril, con la finalidad de contar las unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. pyogenes*. Una vez realizados los lavados bucales, estos fueron sembrados en placas de agar sangre de cordero al 5% (bioMérieux), las que posteriormente fueron incubadas durante 18-24 horas en una estufa con atmosfera de 2% de CO₂. Las colonias con morfología sospechosa fueron identificadas utilizando la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker). Transcurridos los 6 días post-desafío, los ratones fueron sacrificados mediante la inyección de una dosis letal de ketamina+ xilacina (100-200 μ L de una mezcla de 500 μ L de ketamina 10% + 125 μ L de xilacina 2%). Una vez realizado este procedimiento, se removieron los pulmones de los ratones y se fijaron en formalina para la posterior preparación de cortes histológicos embebidos en parafina. Estos cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina, y fueron montados con una resina hidrófoba. Posteriormente, estos fueron observados y fotografiados (software Infinity Capture, Versión 6.4.0) en una zona que fuera representativa de la muestra. El análisis de estas fotografías fue realizado de manera independiente por 3-4 observadores distintos, los que asignaron puntajes ciegamente en base a los siguientes criterios: **0**: sin infiltración celular; **1**: infiltración celular mínima; **2**: infiltración celular leve; **3**: infiltración celular moderada; y **4**: infiltración celular severa (58).

❖ Análisis estadísticos:

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante análisis de varianza de 1 vía (One-way ANOVA) utilizando el software GraphPad Prism, Versión 6.01. Los gráficos de títulos de anticuerpos, pesos, temperaturas, unidades formadoras de colonias y daño pulmonar también fueron creados utilizando este programa.

Resultados

1. Título de anticuerpos IgG generados por la inmunización:

Mediante ELISA, se midió la cantidad de anticuerpos anti-M4, anti-M9 y anti-M12 específicos en muestras de suero obtenidas 14 días después la primera inmunización y 14 días después de cada uno de los refuerzos.

Los resultados de los títulos de anticuerpos anti-M4 y anti-M12 no fueron incluidos, lo cual será discutido posteriormente.

1.1 Título de anticuerpos anti-M9 específicos en suero de ratones inmunizados con *L. lactis*-M9, *L. lactis*-WT y ratones no inmunizados:

El título de anticuerpos anti-M9 obtenido 14 días después de la primera inmunización no mostró diferencia significativa entre los grupos inmunizados con las cepas *L. lactis*-M9, *L. lactis*-WT, y los ratones no inmunizados ($P = 0,08$). El título de anticuerpos obtenido 14 días después del primer refuerzo, fue significativo en el grupo *L. lactis*-M9 al compararlo con el grupo no inmunizado ($P = 0,0295$), pero no así con el grupo *L. lactis*-WT ($P = 0,0672$). El título obtenido 14 días después del segundo refuerzo, fue estadísticamente significativo para el grupo *L. lactis*-M9 al compararlo el grupo *L. lactis*-WT ($P = 0,0391$) y el grupo no inmunizado ($P = 0,0299$) respectivamente. Esto indica que la vacuna *L. lactis*-M9 posee una buena capacidad inmunogénica, ya que genera anticuerpos específicos contra la proteína M9 después del segundo refuerzo inmunológico (**Figura N° 7**).

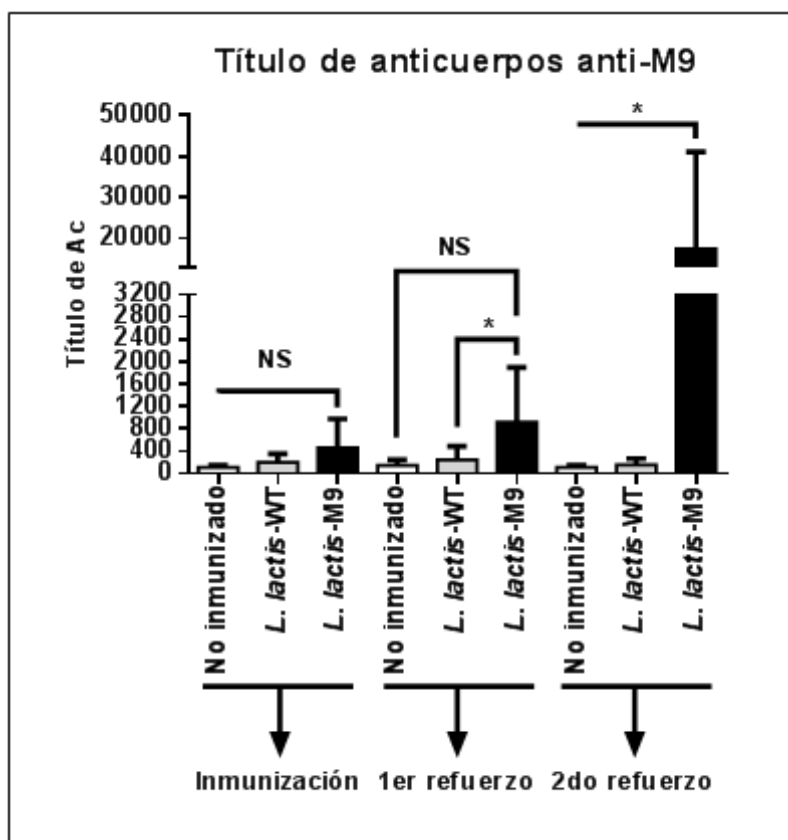


Figura 7: Título de anticuerpos anti-M9 medidos en suero proveniente de ratones inmunizados con *L. lactis*-M9, *L. lactis*-WT y no inmunizados. Cada barra representa el promedio (\pm la desviación estándar) del título de anticuerpos en el suero de ratones provenientes de cada grupo, 14 días después de la primera inmunización y 14 días después del primer y segundo refuerzo respectivamente. *, $P = 0,0299$: comparación mediante ANOVA de una vía de los valores obtenidos después del segundo refuerzo inmunológico entre el grupo de ratones inmunizados con *L. lactis*-M9 y los grupos de ratones no inmunizados y ratones inmunizados con *L. lactis*-WT.

2. Temperatura y peso corporal de los ratones desafiados con *S. pyogenes*:

Una vez que los ratones fueron desafiados con la cepa de *S. pyogenes* que expresaba la proteína para la cual fueron vacunados, se midió la temperatura y peso corporal, ya que en conjunto permiten evaluar la infección y ver si existe un rol protector asociado a la vacuna. Debido a que la temperatura es un parámetro que se restablece rápidamente, la misma fue medida a las 18 horas post-desafío. Por el contrario, el peso al ser un parámetro que vuelve a la normalidad con lentitud, fue medido durante los 6 días posteriores al desafío. También se midió la temperatura y peso antes del desafío (día 0) para asegurar que las variaciones fueran efecto de la intervención y no por alguna condición pre-existente. Debido a que el peso de los ratones es distinto entre todos ellos (a diferencia de la

temperatura), el peso post-desafío fue expresado como porcentaje con respecto al día 0, ya que en este día ellos tienen el 100% de su peso, y en el caso que desarrollen infección por *S. pyogenes* se evidenciara una caída en ese parámetro, y en la temperatura. De no ser así, los ratones sanos deberían mantener o aumentar su peso corporal, y no deberían existir descensos en la temperatura (59).

2.1 Temperatura corporal en ratones inmunizados con *L. lactis*-M4:

Los análisis estadísticos indicaron que a las 18 horas post-desafío se obtuvieron diferencias significativas en la temperatura de los distintos grupos ($P < 0,0001$). Al detallar las comparaciones múltiples, se observó que el grupo *L. lactis*-M4 no presentó diferencia significativa con el grupo sano ($P = 0,4967$), pero sí con el grupo *L. lactis*-WT ($P = 0,0001$) y no inmunizado ($P < 0,0001$). Los valores obtenidos del día 0 no fueron significativos entre los distintos grupos ($P = 0,6243$), indicando que los cambios observados a las 18 horas fueron producto del desafío intranasal con *S. pyogenes* (Figura N° 8).

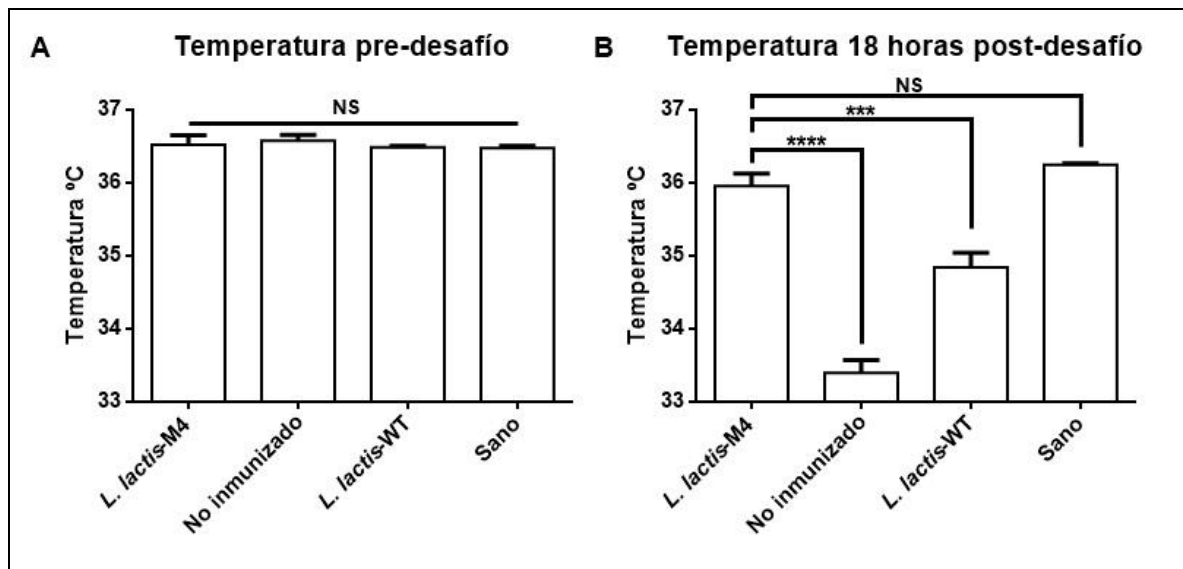


Figura 8: Temperatura corporal medida a las 18 horas post-desafío (*L.lactis*-M4). Cada barra representa el promedio (\pm la desviación estándar) de la temperatura medida en los distintos grupos. **A)** Temperatura de los distintos grupos en el día 0. NS (No significativo): comparación mediante ANOVA de una vía entre los valores provenientes de los distintos grupos. **B)** Temperatura de los distintos grupos a las 18 horas post-desafío. ****, $P < 0,0001$: comparación mediante ANOVA de una vía del valor obtenido entre el grupo de ratones inmunizados con *L. lactis*-M4 y el grupo de ratones no inmunizados.

2.2 Temperatura corporal en ratones inmunizados con *L. lactis*-M9:

Se obtuvieron diferencias significativas en la temperatura de los distintos grupos a las 18 horas post-desafío ($P = 0,0001$). El grupo *L. lactis*-M9 no presentó diferencia significativa con el grupo sano ($P = > 0,9999$), pero si con el grupo *L. lactis*-WT ($P = < 0,0001$) y no inmunizado ($P = < 0,0001$). Los valores obtenidos del día 0 no fueron significativos entre los distintos grupos ($P = 0,6243$), indicando que los cambios observados a las 18 horas fueron producto del desafío intranasal con *S. pyogenes* (Figura N° 9).

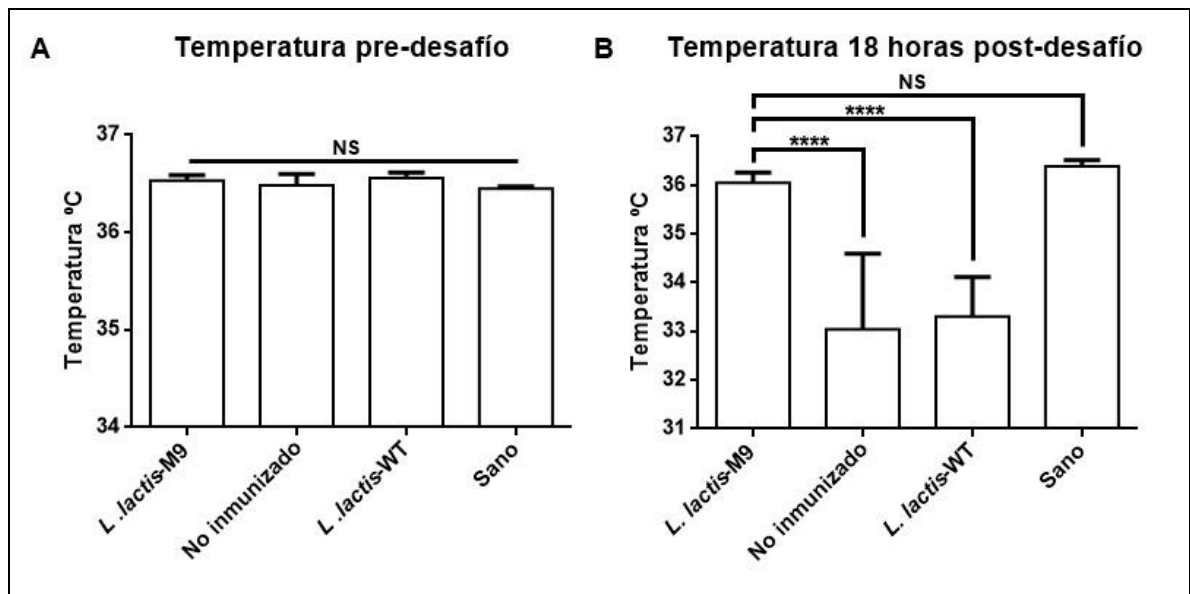


Figura 9: Temperatura corporal medida a las 18 horas post-desafío (*L.lactis*-M9). Cada barra representa el promedio (\pm la desviación estándar) de la temperatura medida en los distintos grupos. **A)** Temperatura de los distintos grupos en el día 0. NS (No significativo): comparación mediante ANOVA de una vía entre los valores provenientes de los distintos grupos. **B)** Temperatura de los distintos grupos a las 18 horas post-desafío. ****, $P = < 0,0001$: comparación mediante ANOVA de una vía del valor obtenido entre el grupo de ratones inmunizados con *L. lactis*-M9 y el grupo de ratones no inmunizados.

2.3 Temperatura corporal en ratones inmunizados con *L. lactis*-M12:

El promedio de temperatura medido a las 18 horas post-desafío mostró diferencias significativas en los distintos grupos ($P = 0,0001$). El grupo *L. lactis*-M12 no presentó diferencia significativa con el grupo sano ($P = > 0,9999$), pero si con el grupo no inmunizado ($P = 0,0003$). El grupo *L. lactis*-M12 no presentó diferencia con el grupo *L. lactis*-WT ($P = 0,5033$), y este último tampoco presentó

diferencias al ser comparado con el grupo sano ($P = 0,0710$). Al igual que el grupo *L. lactis*-M12, el grupo *L. lactis*-WT mostró diferencias con el grupo no inmunizado ($P = 0,0110$). Los valores obtenidos del día 0 no fueron significativos entre los distintos grupos ($P = 0,6243$), indicando que los cambios observados a las 18 horas fueron producto del desafío intranasal con *S. pyogenes* (Figura N° 10).

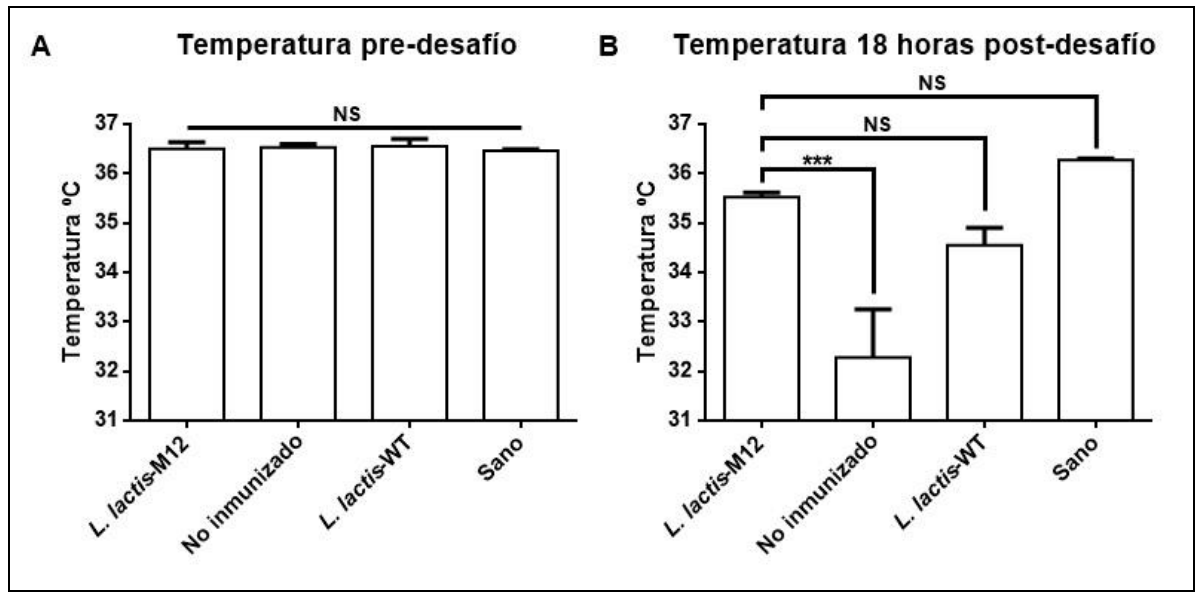


Figura 10: Temperatura corporal medida a las 18 horas post-desafío (*L.lactis*-M12). Cada barra representa el promedio (\pm la desviación estándar) de la temperatura medida en los distintos grupos. **A)** Temperatura de los distintos grupos en el día 0. NS (No significativo): comparación mediante ANOVA de una vía entre los valores provenientes de los distintos grupos. **B)** Temperatura de los distintos grupos a las 18 horas post-desafío. ***, $P = 0,0003$: comparación mediante ANOVA de una vía del valor obtenido entre el grupo de ratones inmunizados con *L. lactis*-M12 y el grupo de ratones no inmunizados.

2.4 Peso corporal en ratones inmunizados con *L. lactis*-M4:

Los pesos obtenidos durante los 6 días posteriores al desafío indicaron que no existe diferencia significativa entre el grupo *L. lactis*-M4 y el grupo sano ($P = > 0,9999$), y que existe diferencia significativa entre el grupo *L.lactis*-M4 y el grupo no inmunizado ($P = 0,0218$). A pesar de que la cepa *L. lactis*-WT no expresa la proteína M específica que lleva la cepa *L. lactis*-M4, no tuvo diferencias significativas con el grupo sano ($P = 0,0973$). Esto parecería indicar que la cepa *L. lactis*-WT estaría cumpliendo un rol protector, pero el valor obtenido al comparar *L. lactis*-WT con el grupo no inmunizado, mostró que no hay diferencias significativas entre ellos ($P = > 0,9999$) (Figura N° 11).

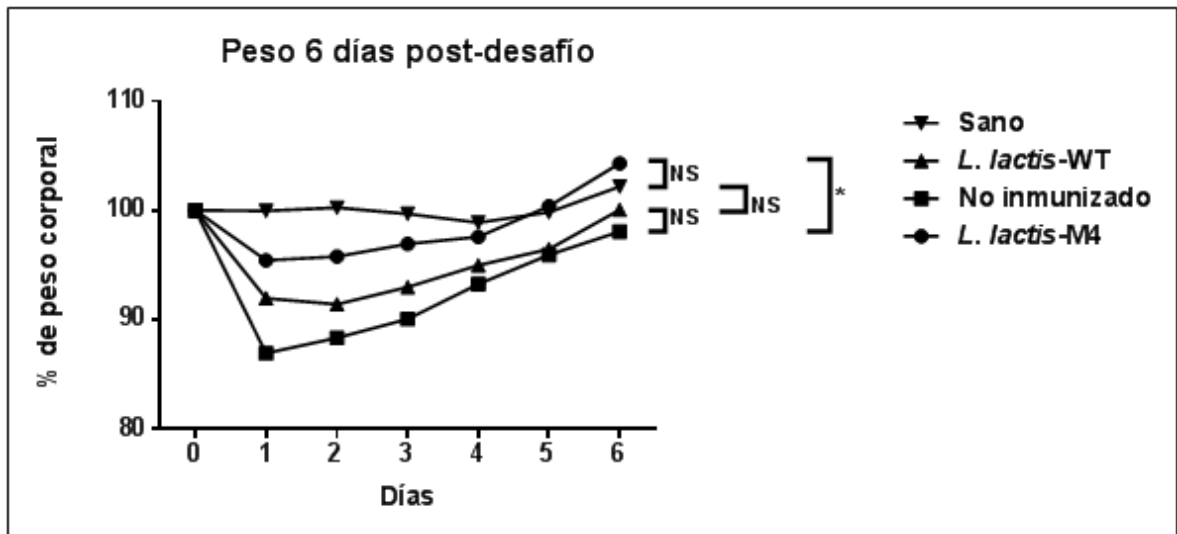


Figura 11: Peso corporal durante los 6 días post-desafío (*L.lactis*-M4). ▼ Grupo Sano, ▲ Grupo *L. lactis*-WT, ■ Grupo no inmunizado, ● Grupo *L. lactis*-M4. El día 0 corresponde al 100% del peso antes del desafío, y desde el día 1 en adelante corresponde a los pesos post-desafío. *, $P = 0,0218$: comparación mediante ANOVA de una vía del valor obtenido entre el grupo de ratones inmunizados con *L. lactis*-M4 y el grupo de ratones no inmunizados.

Si la cepa *L. lactis*-WT estuviera cumpliendo un rol protector, no debiera existir diferencia alguna con el grupo sano dentro del periodo post-desafío. Para determinar esto, se analizó día a día la variación de peso entre los distintos grupos. Este análisis reveló que el grupo *L. lactis*-M4 se mantuvo sin diferencias significativas con el grupo sano durante el periodo post-desafío, a diferencia de la cepa *L. lactis*-WT, que mostró diferencias a las 48 y 72 horas con el grupo sano ($P = 0,0012$ y $P = 0,03$ respectivamente). Además, la cepa *L. lactis*-WT no mostró diferencias significativas con el grupo no inmunizado durante el periodo post-desafío. Los resultados de pesos y temperaturas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo *L. lactis*-M4 y el grupo sano en todo el periodo post-desafío, indicando que la vacuna *L. lactis*-M4 protege a los ratones inmunizados ante el desafío intranasal con *S. pyogenes* (Figura N° 12).

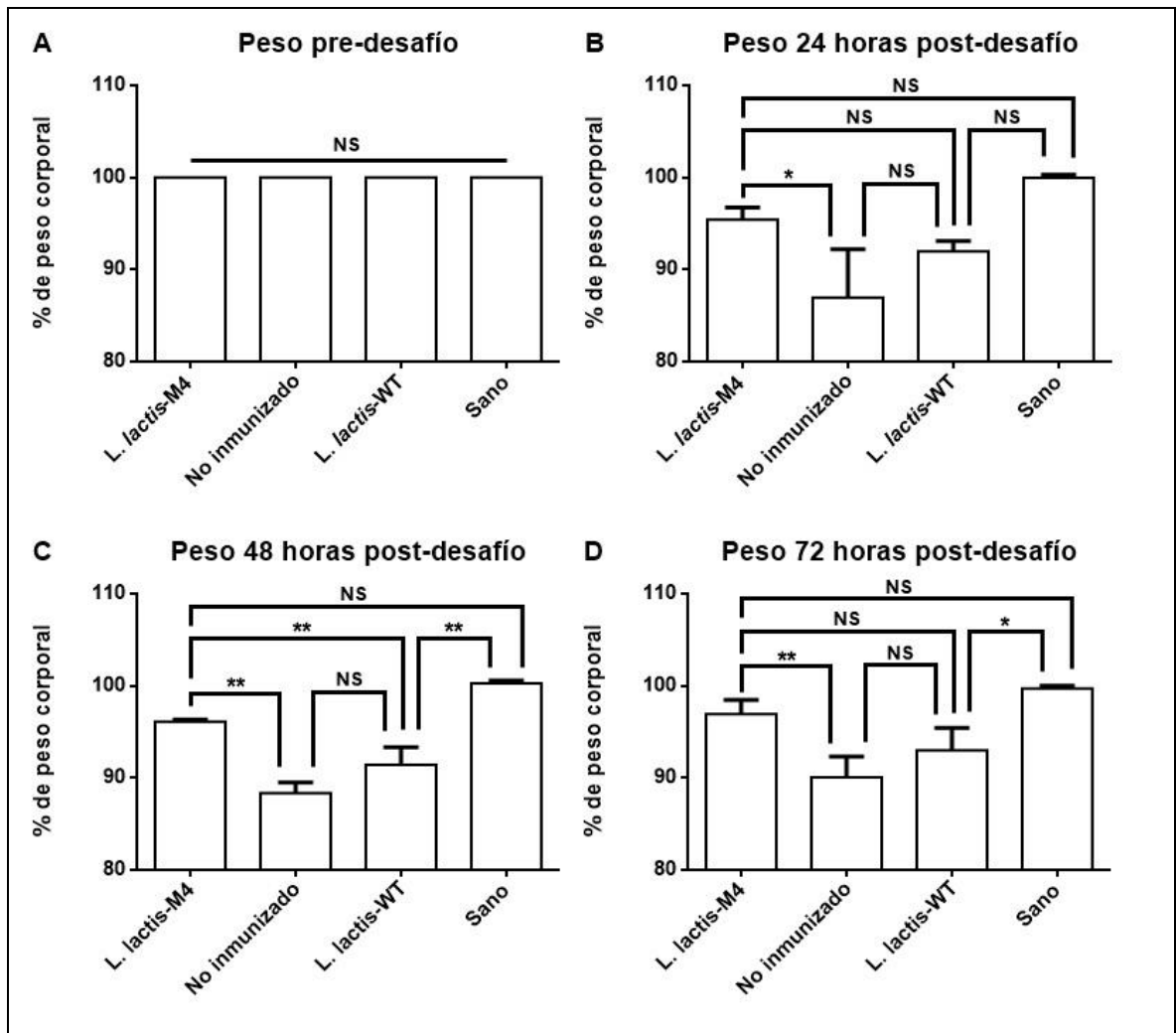


Figura 12: Peso corporal medido día a día una vez realizado el desafío (*L.lactis-M4*). Cada barra representa el promedio (\pm la desviación estándar) de la temperatura medida en los distintos grupos. **A)** Peso de los distintos grupos en el día 0. NS (No significativo): comparación mediante ANOVA de una vía entre los valores provenientes de los distintos grupos. **B)** Peso de los distintos grupos a las 24 horas post-desafío. NS (No significativo): comparación mediante ANOVA de una vía del valor obtenido entre el grupo de ratones inmunizados con *L. lactis-WT* y el grupo de ratones sanos. **C)** Peso de los distintos grupos a las 48 horas post-desafío. **, $P = 0,0012$: comparación mediante ANOVA de una vía del valor obtenido entre el grupo de ratones inmunizados con *L. lactis-WT* y el grupo de ratones sanos. **D)** Peso de los distintos grupos a las 72 horas post-desafío. *, $P = 0,03$: comparación mediante ANOVA de una vía del valor obtenido entre el grupo de ratones inmunizados con *L. lactis-WT* y el grupo de ratones sanos.

2.5 Peso corporal en ratones inmunizados con *L. lactis*-M9:

La comparación de los pesos obtenidos durante los 6 días posteriores al desafío mostró que existe diferencia significativa entre los distintos grupos analizados ($P = 0,0001$). No se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo *L. lactis*-M9 y el grupo sano ($P = > 0,9999$), pero si al comparar el grupo *L. lactis*-M9 con los grupos *L. lactis*-WT ($P = 0,0008$) y no inmunizado ($P = < 0,0001$) (Figura N° 13).

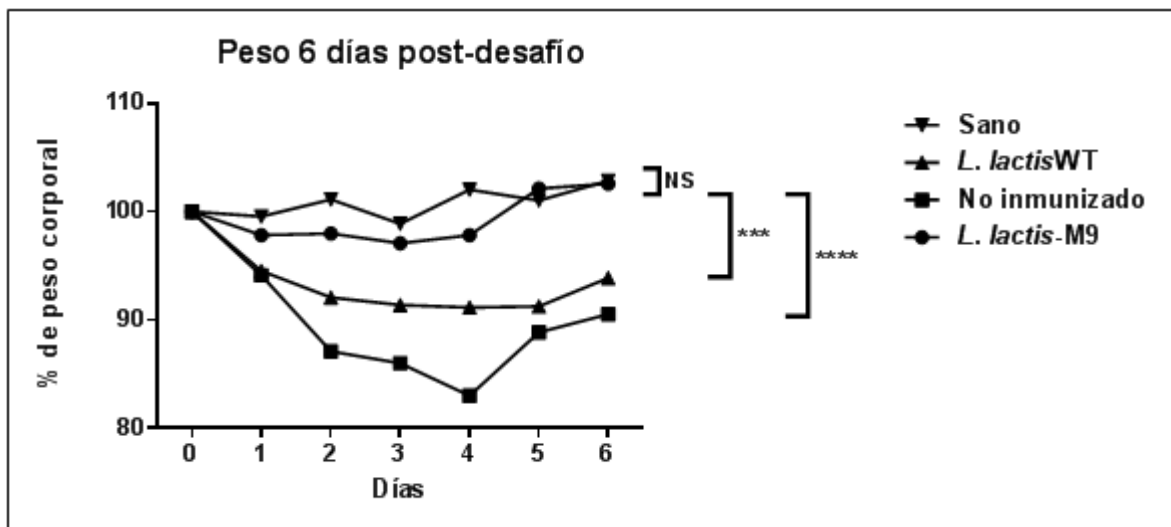


Figura 13: Peso corporal medido durante los 6 días post-desafío (*L. lactis*-M9). ▼ Grupo Sano, ▲ Grupo *L. lactis*-WT, ■ Grupo no inmunizado, ● Grupo *L. lactis*-M9. El día 0 corresponde al 100% del peso antes del desafío, y desde el día 1 en adelante corresponde a los pesos post-desafío. ****, $P = < 0,0001$: comparación mediante ANOVA de una vía del valor obtenido entre el grupo de ratones inmunizados con *L. lactis*-M9 y el grupo de ratones no inmunizados.

Los resultados de pesos y temperaturas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo *L. lactis*-M9 y el grupo sano en el periodo post-desafío, indicando que la vacuna *L. lactis*-M9 protege a los ratones inmunizados ante el desafío intranasal con *S. pyogenes*.

2.6 Peso corporal en ratones inmunizados con *L. lactis*-M12:

Durante los 6 días posteriores al desafío se pudo observar que existe diferencia significativa entre los pesos de los distintos grupos analizados ($P = 0,0001$). No se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo *L. lactis*-M12 y el grupo sano ($P = > 0,9999$), pero si al comparar el grupo *L. lactis*-M12 con los grupos *L. lactis*-WT ($P = 0,0357$) y no inmunizado ($P = < 0,0001$) (Figura N° 14).

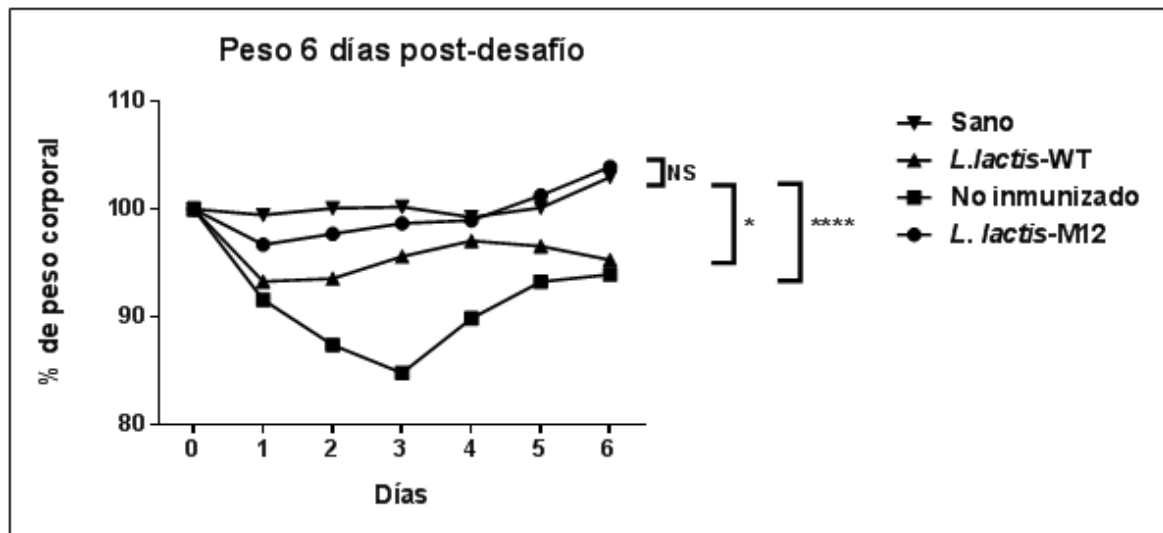


Figura 14: Peso corporal medido durante los 6 días post-desafío (*L.lactis*-M12). ▲ Grupo Sano, Grupo *L.lactis*-WT, ■ Grupo no inmunizado, ● Grupo *L.lactis*-M12. El día 0 corresponde al 100% del peso antes del desafío, y desde el día 1 en adelante corresponde a los pesos post-desafío. ****, $P = < 0,0001$: comparación mediante ANOVA de una vía del valor obtenido entre el grupo de ratones inmunizados con *L.lactis*-M12 y el grupo de ratones no inmunizados.

Debido a que no existen diferencias significativas entre la cepa *L.lactis*-WT y la cepa *L.lactis*-M12 en los análisis de temperatura (18 horas), se podría pensar que confiere protección contra el desafío, pero los análisis de peso no son concordantes con esta hipótesis. Los resultados de pesos y temperaturas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo *L.lactis*-M12 y el grupo sano en el periodo post-desafío, pero si entre el grupo *L.lactis*-M12 y no inmunizado, indicando que la vacuna *L.lactis*-M12 protege a los ratones inmunizados ante el desafío intranasal con *S.pyogenes*.

3. Unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. pyogenes* en lavados bucales:

Para determinar el número de unidades formadoras de colonias, se observaron las placas en búsqueda de colonias con la morfología característica desarrollada por *S. pyogenes* en cultivo, la cual es de color blanca, con un tamaño de 1 a 2 mm con grandes zonas de β -hemólisis.

Los resultados de las unidades formadoras de colonias para las vacunas *L. lactis*-M4 y *L. lactis*-M12 no fueron incluidos, lo cual será discutido posteriormente.

3.1 Unidades formadoras de colonias en ratones inmunizados con *L. lactis*-M9:

Al comparar el número de UFC obtenido, se pudo determinar que existen diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas post-desafío entre los diferentes grupos de experimentación ($P = 0,0003$). El grupo *L. lactis*-M9 no presentó diferencia significativa con el grupo sano ($P = > 0,9999$), pero sí con el grupo no inmunizado ($P = 0,0005$). El grupo *L. lactis*-M9 no presentó diferencia con el grupo *L. lactis*-WT ($P = 0,9999$), y este último tampoco presentó diferencias al ser comparado con el grupo sano ($P = 0,9999$). Al igual que el grupo *L. lactis*-M9, el grupo *L. lactis*-WT mostró diferencias con el grupo no inmunizado ($P = 0,0007$). Los valores de UFC obtenidas a las 48 horas post-desafío no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos ($P = 0,2722$) (**Figura N° 15**). Los valores de UFC correspondientes a las 72 horas no fueron analizados, debido a que no se observó desarrollo de colonias sospechosas en ninguno de los grupos.

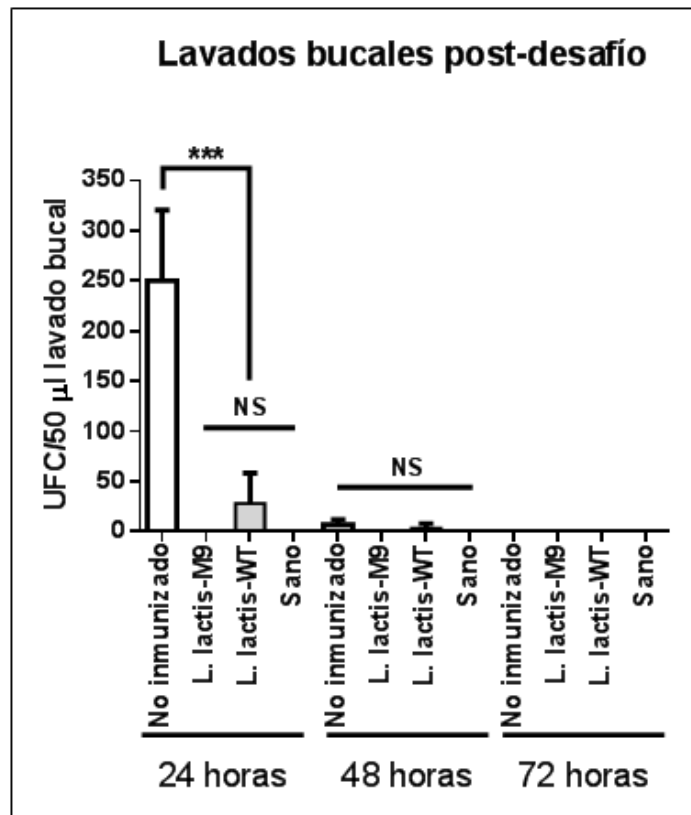


Figura 15: UFC de *S. pyogenes* en ratones inmunizados con *L.lactis*-M9, *L. lactis*-WT, no inmunizados y sanos. Cada barra representa el promedio (\pm la desviación estándar) de las UFC contadas desde los lavados bucales de ratones provenientes de cada grupo a las 24 y 48 horas post-desafío. ****, $P = 0,0005$: comparación mediante ANOVA de una vía de los valores obtenidos después de 24 horas post-desafío entre el grupo de ratones no inmunizados y el grupo de ratones inmunizados con *L. lactis*-M9.

4. Daño pulmonar evaluado en ratones desafiados con *S. pyogenes*:

Para cada grupo experimental, el grado de daño pulmonar fue evaluado mediante la observación de micrografías obtenidas a partir de cortes histológicos de pulmón. En un corte histológico normal se pueden observar un gran número de alveolos, lo cuales se caracterizan por verse el microscopio como zonas ópticamente vacías, y por poseer macrófagos residentes en su parénquima. Al desencadenarse la infección, la anatomía normal del alveolo se ve comprometida, por la presencia de múltiples infiltrados de células inmunitarias que migran al sitio de infección (60).

4.1 Daño pulmonar en ratones inmunizados con *L. lactis*-M4:

Los puntajes asignados indicaron que existen diferencias estadísticamente significativas en el daño pulmonar observado entre los distintos grupos ($P = 0,0001$). El grupo *L. lactis*-M4 no presentó diferencia significativa con el grupo sano ($P = 0,0943$), pero si con el grupo *L. lactis*-WT ($P = 0,0398$) y no inmunizado ($P = 0,0007$) (Figura N° 16). Esto indica que la vacuna *L. lactis*-M4 posee una buena capacidad protectora, al prevenir el daño histopatológico observado en los grupos de ratones enfermos (Figura N° 17).

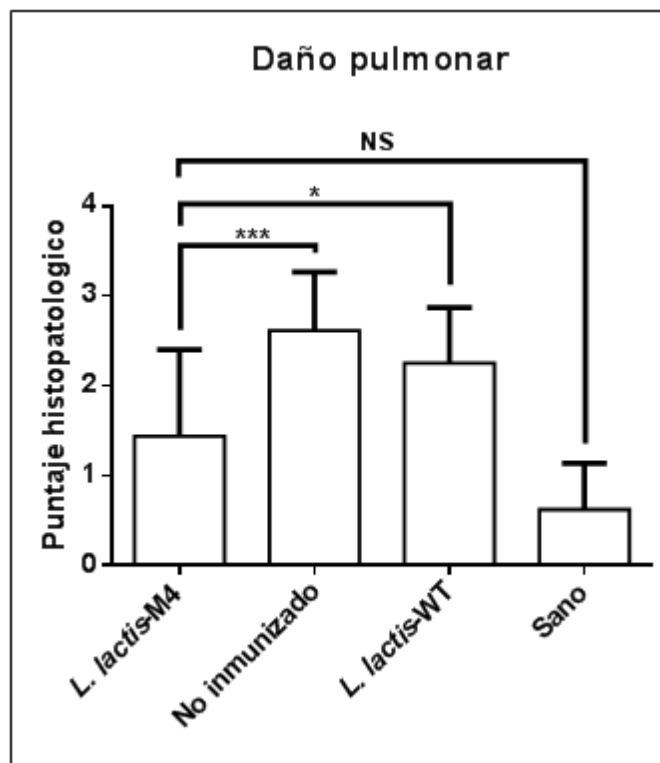


Figura 16: Puntajes de daño pulmonar en ratones inmunizados con *L.lactis*-M4. Cada barra representa el promedio (\pm la desviación estándar) del daño pulmonar evaluado en los distintos grupos. ***, $P = 0,0007$: comparación mediante ANOVA de una vía del valor obtenido entre el grupo de ratones inmunizados con *L. lactis*-M4 y el grupo de ratones no inmunizados. 0: sin infiltración celular; 1: infiltración celular mínima; 2: infiltración celular leve; 3: infiltración celular moderada; y 4: infiltración celular severa.

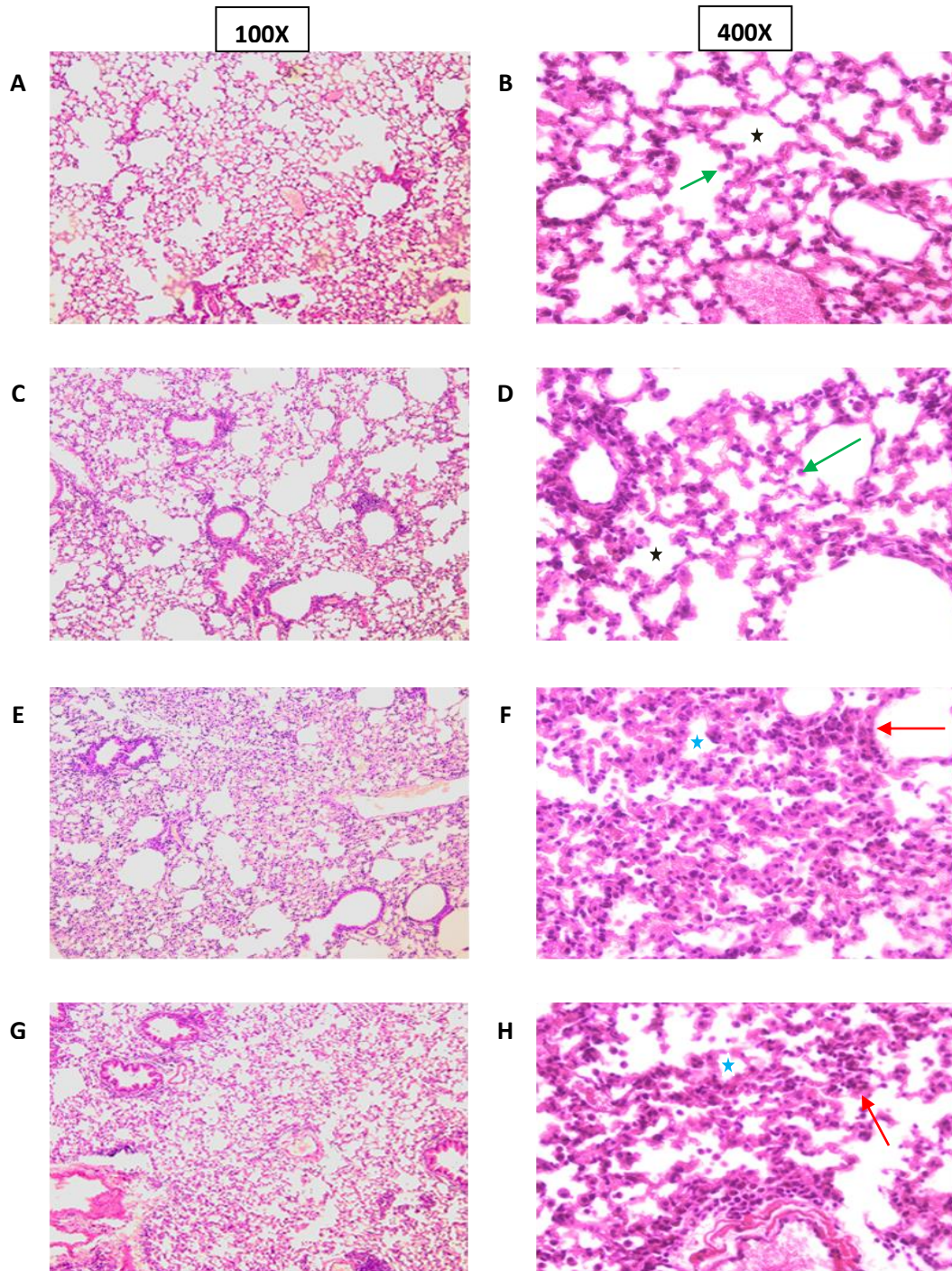


Figura 17: Micrografías de cortes histológicos en ratones inmunizados con *L.lactis*-M4. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina y examinadas con aumento de 100X (A, C, E, G) y 400X (B, D, F, H). **Flecha de color verde:** células inmunes propias del parénquima pulmonar. **Flecha de color rojo:** células inmunes reclutadas producto de la infección. **Estrella de color negro:** alveolo normal. **Estrella de color celeste:** alteración de la arquitectura alveolar. **A y B)** Grupo Sano. **C y D)** Grupo *L. lactis*-M4. **E y F)** Grupo No inmunizado. **G y H)** Grupo *L. lactis*-WT. En las imágenes **A-D** se observa la estructura normal de los alveolos. En las imágenes **E-H** se observa que los alveolos han perdido su normalidad debido a la gran cantidad de células infiltradas producto de la infección causada por *S. pyogenes*.

4.2 Daño pulmonar en ratones inmunizados con *L. lactis*-M9:

Los puntajes asignados indicaron que existen diferencias estadísticamente significativas en el daño pulmonar observado entre los distintos grupos ($P = 0,0001$). El grupo *L. lactis*-M9 no presentó diferencia significativa con el grupo sano ($P = > 0,9999$), pero si con el grupo *L. lactis*-WT ($P = 0,0010$) y no inmunizado ($P = 0,0001$) (**Figura N° 18**). Esto indica que la vacuna *L. lactis*-M9 protege al ratón inmunizado del daño histopatológico observado en los grupos de ratones enfermos (**Figura N° 19**).

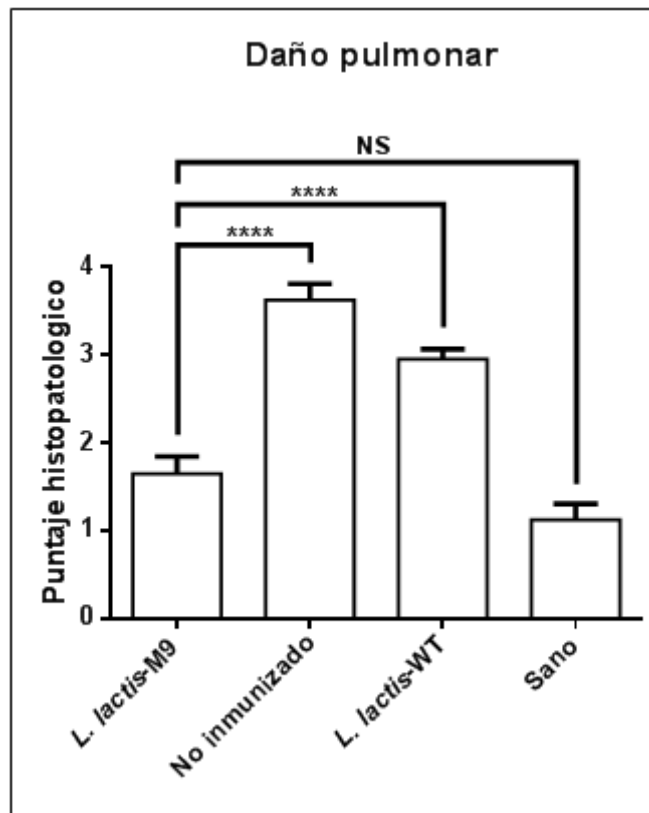


Figura 18: Puntaje de daño pulmonar en ratones inmunizados con *L.lactis*-M9. Cada barra representa el promedio (\pm la desviación estándar) del daño pulmonar evaluado en los distintos grupos. ****, $P = < 0,0001$: comparación mediante ANOVA de una vía del valor obtenido entre el grupo de ratones inmunizados con *L. lactis*-M9 y el grupo de ratones no inmunizados. 0: sin infiltración celular; 1: infiltración celular mínima; 2: infiltración celular leve; 3: infiltración celular moderada; y 4: infiltración celular severa.

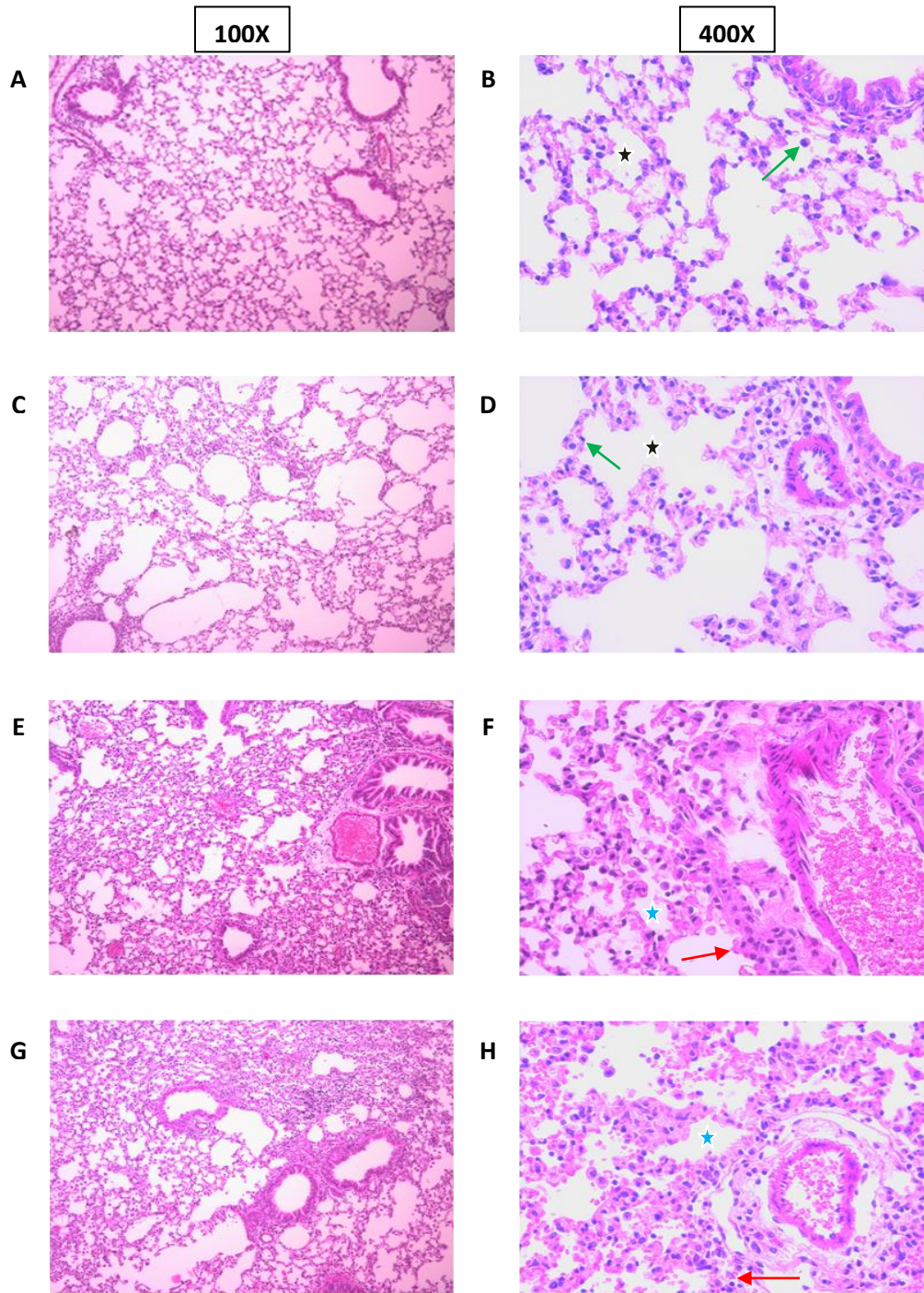


Figura 19: Micrografías de cortes histológicos en ratones inmunizados con *L.lactis*-M9. A y B) Grupo Sano, C y D) Grupo *L. lactis*-M9, E y F) Grupo No inmunizado, G y H) Grupo *L. lactis*-WT. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina y examinadas con aumento de 100X (A, C, E, G) y 400X (B, D, F, H). Flecha de color verde: células inmunes propias del parénquima pulmonar. Flecha de color rojo: células inmunes reclutadas producto de la infección. Estrella de color negro: alveolo normal. Estrella de color celeste: alteración de la arquitectura alveolar. A y B) Grupo Sano. C y D) Grupo *L. lactis*-M4. E y F) Grupo No inmunizado. G y H) Grupo *L. lactis*-WT. En las imágenes A-D se observa la estructura normal de los alveolos. En las imágenes E-H se observa que los alveolos han perdido su normalidad debido a la gran cantidad de células infiltradas producto de la infección causada por *S. pyogenes*.

4.3 Daño pulmonar en ratones inmunizados con *L. lactis*-M12:

Los puntajes asignados indicaron que existen diferencias estadísticamente significativas en el daño pulmonar observado entre los distintos grupos ($P = 0,0001$). El grupo *L. lactis*-M12 no presentó diferencia significativa con el grupo sano ($P = 0,9999$), pero si con el grupo *L. lactis*-WT ($P = < 0,0001$) y no inmunizado ($P = < 0,0001$) (Figura N° 20). Esto indica que la vacuna *L. lactis*-M12 protege al ratón inmunizado del daño histopatológico observado en los grupos de ratones enfermos (Figura N° 21).

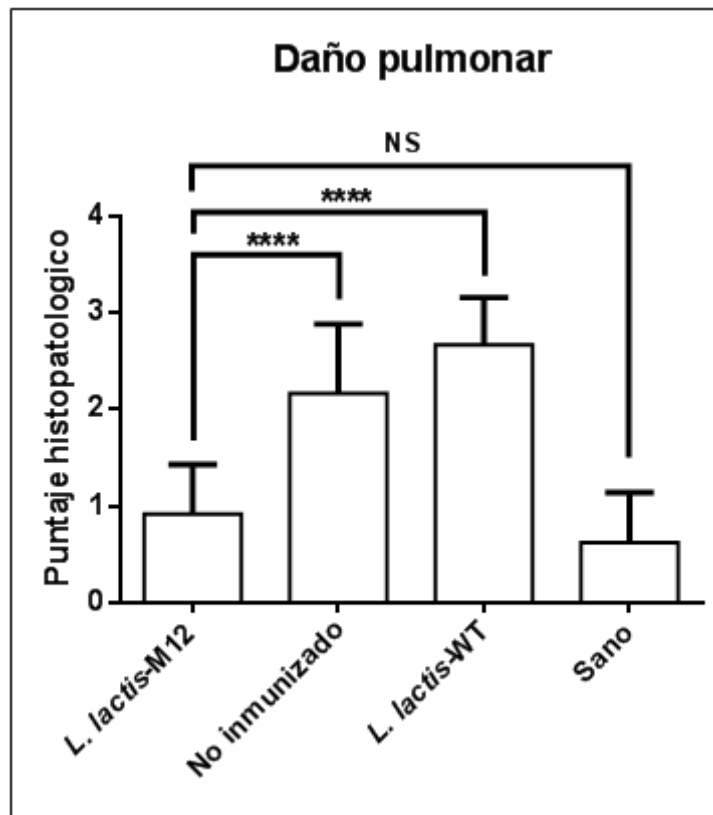


Figura 20: Puntaje de daño pulmonar en ratones inmunizados con *L.lactis*-M12. Cada barra representa el promedio (\pm la desviación estándar) del daño pulmonar evaluado en los distintos grupos. . ****, $P = < 0,0001$: comparación mediante ANOVA de una vía del valor obtenido entre el grupo de ratones inmunizados con *L. lactis*-M12 y el grupo de ratones no inmunizados. 0: sin infiltración celular; 1: infiltración celular mínima; 2: infiltración celular leve; 3: infiltración celular moderada; y 4: infiltración celular severa.

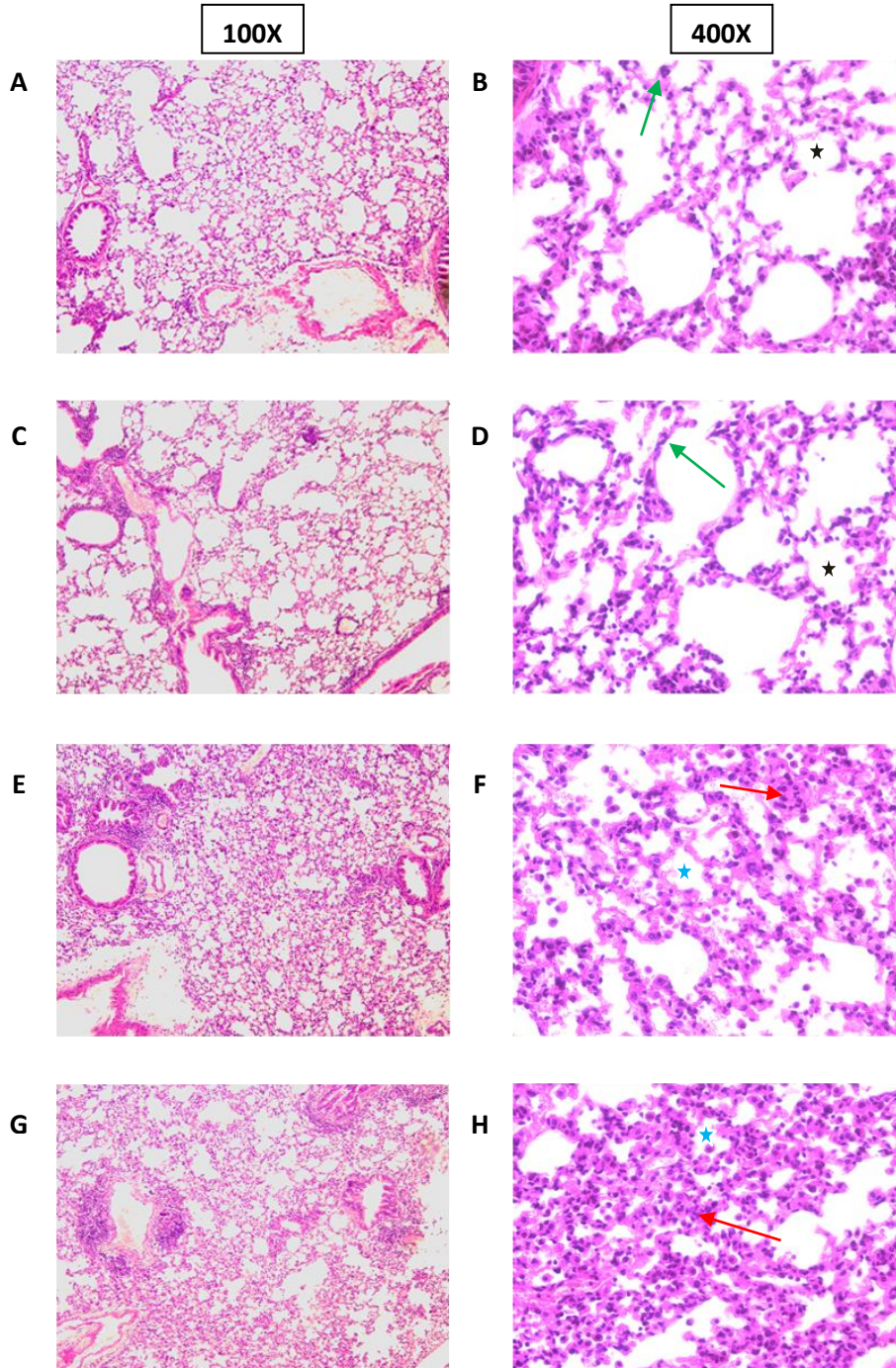


Figura 21: Micrografías de cortes histológicos en ratones inmunizados con *L.lactis*-M12. A y B) Grupo Sano, C y D) Grupo *L. lactis*-M12, E y F) Grupo No inmunizado, G y H) Grupo *L. lactis*-WT. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina y examinadas con aumento de 100X (A, C, E, G) y 400X (B, D, F, H). **Flecha de color verde:** células inmunes propias del parénquima pulmonar. **Flecha de color rojo:** células inmunes reclutadas producto de la infección. **Estrella de color negro:** alveolo normal. **Estrella de color celeste:** alteración de la arquitectura alveolar. A y B) Grupo Sano. C y D) Grupo *L. lactis*-M4. E y F) Grupo No inmunizado. G y H) Grupo *L. lactis*-WT. En las imágenes A-D se observa la estructura normal de los alveolos. En las imágenes E-H se observa que los alveolos han perdido su normalidad debido a la gran cantidad de células infiltradas producto de la infección causada por *S. pyogenes*.

Discusión

Se evaluó la eficacia de 3 cepas vaccinales intranasalmente para proteger a ratones BALB/c ante el desafío contra *S. pyogenes*. Para esto se determinó la capacidad inmunogénica y protectora de las vacunas *L. lactis*-M4, *L. lactis*-M9 y *L. lactis*-M12, mediante el análisis del título de anticuerpos, medición de temperatura y peso corporal, conteo de unidades formadoras de colonias en lavados bucales y determinación del daño pulmonar.

El modelo de experimentación utilizado (ratones BALB/c) permitió evaluar los distintos parámetros indicados en los objetivos de esta tesis debido a su gran capacidad para sobrevivir a la infección por *S. pyogenes*, además de su fácil manipulación para la obtención de muestras. A pesar de ser el modelo más utilizado, existen investigadores que han optado por otros modelos animales, como son ratas, conejos, y primates no humanos. Estos últimos al encontrarse mejor relacionados con los humanos, permiten el desarrollo adecuado de algunas patologías, como la faringitis, apoyando de esta manera la relevancia clínica del modelo frente a los anteriormente mencionados (61).

La vacuna *L. lactis*-M9 fue capaz de generar una respuesta humoral sistémica al ser administrada por vía intranasal. Al igual como ocurre con los modelos de experimentación, se han probado otras vías de vacunación, como es la vía intraperitoneal (48), y la vía intravenosa (62). Además de las ventajas inmunológicas que posee la administración intranasal (genera inmunidad sistémica y de mucosas), se agrega una ventaja importante, que corresponde a evitar el dolor intrínseco generado por las vacunas parenterales. La vía intranasal también posee ventajas técnicas, ya que para su administración no existe necesidad de utilizar jeringas y contar con personal especializado, ayudando de esta manera a disminuir los costos asociados (44).

Aunque no se determinaron los niveles de IgA en saliva, en los lavados bucales realizados a los ratones inmunizados con *L. lactis*-M9 no se recuperaron UFC de *S. pyogenes*, lo que podría indicar que la inmunización afecta a los procesos de colonización y/o infección desencadenados por *S. pyogenes* a nivel de mucosa, actuando de esta manera como una primera línea de protección (44, 63). Otros estudios realizados en ratones han detectado poca o nula cantidad de IgA, pero a pesar de esto la protección a nivel de mucosa fue satisfactoria. Esto podría deberse a un posible rol protector de la IgG presente en el suero (44). Las UFC para las vacunas *L. lactis*-M4 y *L. lactis*-M12

no fueron contadas debido a la presencia de contaminación en las placas, lo cual se puede deber a un error en la siembra, o a la contaminación con flora normal propia de la cavidad oral de los ratones (64).

El título de anticuerpos IgG obtenido para la vacuna *L. lactis*-M9 después del segundo refuerzo inmunológico fue similar al obtenido con vacunas multivalentes basadas en proteínas de fusión purificadas (48). El análisis del título de anticuerpos específicos anti-M4 y anti-M12 no pudo ser determinado, debido a que los resultados obtenidos mostraron ausencia absoluta de señal al revelar la reacción de ELISA. Para descartar un posible error en el procedimiento, los análisis fueron repetidos, pero los resultados no fueron distintos a los observados anteriormente. Se utilizó como control positivo el ELISA para anticuerpos anti-M9 el cual funcionó óptimamente. La única diferencia entre los ELISA para anti-M4, anti-M9 y anti-M12 es el péptido utilizado. La superficie de las placas de ELISA utilizadas están compuestas de poliestireno modificado, el cual presenta grupos carboxilos e hidroxilos (COOH y OH) que establecen interacciones hidrofílicas con el antígeno, comúnmente conocidas como placas de alta captación o “high binding” (65). Al identificar las regiones inmunogénicas de cada uno de los péptidos utilizados (**Tabla N° 1**), se analizó la naturaleza de la secuencia aminoacídica presente en cada una de ellas, con la finalidad de comprender las posibles interacciones que podría establecer el antígeno con la placa y como esto afectaría la unión del anticuerpo. Esto reveló que tanto los péptidos M4 y M12 contienen solo una región inmunogénica, las cuales presentan un predominio de aminoácidos de tipo polar, ácidos y básicos, por lo que las interacciones establecidas entre estos aminoácidos y la placa altamente hidrofílica (puentes de hidrogeno y atracciones electroestáticas), resultarían en el enmascaramiento del epítipo, viéndose reflejado en la ausencia de señal. Por el contrario, en el caso del péptido M9, el análisis reveló la presencia de tres regiones inmunogénicas y además se observó una menor presencia de aminoácidos de tipo polar, ácidos y básicos en dichas regiones, por lo que las interacciones establecidas con la placa serían a través de otras regiones distintas a las inmunogénicas, lo cual dejaría libres estas regiones para que interactúen con los anticuerpos. Además la presencia de 3 regiones inmunogénicas aumentaría la probabilidad de unión del anticuerpo con el antígeno. Se ha reportado que la ausencia de señal podría mejorarse adicionando un péptido de captura en el extremo N-terminal del péptido utilizado, ya que sería esta la región que interaccionaría directamente con la placa dejando el epítipo libre, lo cual favorecería el reconocimiento por parte del anticuerpo (66).

El análisis de las micrografías obtenidas para evaluar el daño pulmonar en el 6° día post-desafío, mostró que los grupos inmunizados individualmente con las 3 cepas vaccinales *L. lactis*-M4, *L. lactis*-M9 y *L. lactis*-M12 exhibieron una apariencia histopatológica normal similar a la observada en el grupo sano. Al contrario, la examinación histológica de los grupos *L. lactis*-WT y no inmunizados mostraron múltiples áreas con infiltración severa de células polimorfonucleares que alteraron por completo la arquitectura normal de los alveolos. A pesar de no contar con los títulos de anticuerpos de tipo IgG para las vacunas *L. lactis*-M4 y *L. lactis*-M12, probablemente (al igual que la vacuna *L. lactis*-M9) estos serían los responsables de actuar como segunda línea de protección al bloquear el proceso de invasión celular (63).

Al contrario de las cepas vaccinales *L. lactis*-M4, *L. lactis*-M9 y *L. lactis*-M12, la cepa *L. lactis*-WT no tuvo un rol protector ante la infección, aunque en algunos parámetros medidos dentro de las distintas vacunas evaluadas (temperatura *L. lactis*-M12 y peso corporal *L. lactis*-M4), mostró diferencias significativas al ser comparado con el grupo de ratones no inmunizados. Esto se podría deber a una reacción cruzada, ya que el análisis de árboles filogenéticos basados en secuencias de ARNr 16S muestran homologías que indican que *Lactococcus lactis* y *Streptococcus pyogenes* se encuentran estrechamente relacionados evolutivamente (67), incluso anteriormente *Lactococcus lactis* se encontraba clasificado como *Streptococcus lactis* (68). Además, *L. lactis* y *S. pyogenes* al ser microorganismos Gram positivos comparten patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como el peptidoglicano y el ácido lipoteicoico (69, 70).

Como se indicó anteriormente, *Lactococcus lactis* es un microorganismo no patógeno en humanos, que forma parte de la flora normal de las superficies mucocutáneas, por lo que el riesgo de infección es bajo, lo cual sería ventajoso especialmente en niños, ancianos y personas inmunocomprometidas (71, 72). A pesar de esta última afirmación, en los últimos años se han reportado en la literatura algunos casos puntuales de pacientes con inmunosupresión que han desarrollado enfermedad originada por *L. lactis*, pero cuyo origen no proviene de vacunas basadas en este microorganismo (72-75). Ante esta evidencia, el grado de inmunosupresión de los individuos que pretenden ser vacunados debe ser evaluado por un especialista, ya que las vacunas vivas generalmente deberían aplazarse hasta que la función inmune haya mejorado, de otra manera estas no deben ser indicadas (76). La vacuna propuesta está diseñada para ser administrada a niños en edad escolar, ya que corresponde a un periodo crítico donde las infecciones por *S. pyogenes* son más frecuentes, como es el caso de la faringitis y secuelas post estreptocócicas.

Conclusión

Los resultados obtenidos en esta Tesis permiten concluir que las vacunas *L. lactis*-M4, *L. lactis*-M9 y *L. lactis*-M12 son eficaces, ya que protegieron a los ratones frente al desafío con *S. pyogenes*. Además, proveen una nueva aproximación en el diseño de una vacuna multivalente que puede ser producida a bajo costo en base a los datos epidemiológicos de la región donde pretende ser aplicada, y fácilmente administrada. En un futuro, estos resultados permitirían contribuir de manera efectiva a solucionar este importante problema de salud pública que afecta a la población de nuestro país, y del resto del mundo.

Referencias Bibliográficas

1. Mandell GI, Bennett JE, Dolin R. Classification of Streptococci. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. p. 2591–2.
2. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Streptococcus*. Microbiología Médica. Barcelona: Elsevier; 2009. p. 225-33.
3. Bessen DE. Population biology of the human restricted pathogen, *Streptococcus pyogenes*. Infect Genet Evol. 2009;9(4):581-93.
4. Mandell GI, Bennett JE, Dolin R. *Streptococcus pyogenes*. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. p. 2593–610.
5. Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. Clinical microbiology reviews. 2000;13(3):470-511.
6. Todar's. Online Textbook of Bacteriology. Available from: http://textbookofbacteriology.net/streptococcus_3.html.
7. Mandell GI, Bennett JE, Dolin R. Nonsuppurative Poststreptococcal Sequelae: Rheumatic Fever and Glomerulonephritis. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. p. 2611-22.
8. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. The Lancet infectious diseases. 2005;5(11):685-94.
9. The Current Evidence for the Burden of Group A Streptococcal Diseases. World Health Organization, 2005.
10. Ralph AP, Carapetis JR. Group a streptococcal diseases and their global burden. Curr Top Microbiol Immunol. 2013;368:1-27.
11. Munoz S, Cordova M, Morales V, Cifuentes L. Sore throat, streptococcal etiology? Use of etiological screening and antimicrobial prescription in two university pediatric centers. Rev Chilena Infectol. 2005;22(2):147-53.
12. Berrios X, Lagomarsino E, Solar E, Sandoval G, Guzman B, Riedel I. Post-streptococcal acute glomerulonephritis in Chile--20 years of experience. Pediatr Nephrol. 2004;19(3):306-12.
13. Vigilancia de laboratorio de enfermedad invasora por *Streptococcus pyogenes*. Instituto de Salud Publica de Chile; 2012.
14. Vigilancia de laboratorio de enfermedad invasora por *Streptococcus pyogenes*, Chile 2009 – 2013. Instituto de Salud Publica de Chile; 2013.
15. The Australian guideline for prevention, diagnosis and management of acute rheumatic fever and rheumatic heart disease (2nd edition). National Heart Foundation of Australia and the Cardiac Society of Australia and New Zealand. , 2012.
16. Rodriguez C, Rojas P, Wozniak A, Kalergis AM, Ceron I, Riedel I, et al. [Resistance phenotypes and genotypes of *Streptococcus pyogenes* clinical isolates in Chile over a 10-year period]. Revista medica de Chile. 2011;139(9):1143-9.
17. Bisno AL, Brito MO, Collins CM. Molecular basis of group A streptococcal virulence. The Lancet infectious diseases. 2003;3(4):191-200.
18. Walker MJ, Barnett TC, McArthur JD, Cole JN, Gillen CM, Henningham A, et al. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group a *Streptococcus*. Clinical microbiology reviews. 2014;27(2):264-301.
19. Fischetti VA NR, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI. Extracellular Matrix Interactions with Gram-Positive Pathogens. Gram-Positive Pathogens. Washington, DC: ASM Press; 2000. p. 78-86.

20. Smeesters PR, McMillan DJ, Sriprakash KS. The streptococcal M protein: a highly versatile molecule. *Trends Microbiol.* 2010;18(6):275-82.
21. Fischetti VA. Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clinical microbiology reviews.* 1989;2(3):285-314.
22. Smeesters PR, Mardulyn P, Vergison A, Leplae R, Van Melderen L. Genetic diversity of Group A *Streptococcus* M protein: implications for typing and vaccine development. *Vaccine.* 2008;26(46):5835-42.
23. Steer AC, Law I, Matatolu L, Beall BW, Carapetis JR. Global emm type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. *The Lancet infectious diseases.* 2009;9(10):611-6.
24. Fischetti VA NR, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI. Surface Proteins on Gram-Positive Bacteria. *Gram-Positive Pathogens.* Washington, DC: ASM Press; 2000. p. 11-24.
25. Wang JR, Stinson MW. M protein mediates streptococcal adhesion to HEp-2 cells. *Infection and immunity.* 1994;62(2):442-8.
26. Okada N, Liszewski MK, Atkinson JP, Caparon M. Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995;92(7):2489-93.
27. Olsen RJ, Shelburne SA, Musser JM. Molecular mechanisms underlying group A streptococcal pathogenesis. *Cellular microbiology.* 2009;11(1):1-12.
28. LaPenta D, Rubens C, Chi E, Cleary PP. Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1994;91(25):12115-9.
29. Cole JN, Barnett TC, Nizet V, Walker MJ. Molecular insight into invasive group A streptococcal disease. *Nature reviews Microbiology.* 2011;9(10):724-36.
30. Kwinn LA, Nizet V. How group A *Streptococcus* circumvents host phagocyte defenses. *Future microbiology.* 2007;2(1):75-84.
31. Nilsson M, Weineisen M, Andersson T, Truedsson L, Sjobring U. Critical role for complement receptor 3 (CD11b/CD18), but not for Fc receptors, in killing of *Streptococcus pyogenes* by neutrophils in human immune serum. *European journal of immunology.* 2005;35(5):1472-81.
32. Johnson DR, Kurlan R, Leckman J, Kaplan EL. The human immune response to streptococcal extracellular antigens: clinical, diagnostic, and potential pathogenetic implications. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2010;50(4):481-90.
33. Husmann LK, Dillehay DL, Jennings VM, Scott JR. *Streptococcus pyogenes* infection in mice. *Microbial pathogenesis.* 1996;20(4):213-24.
34. Medina E, Lengeling A. Genetic regulation of host responses to group A *Streptococcus* in mice. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2005;4(3):248-57.
35. Goldmann O, Lehne S, Medina E. Age-related susceptibility to *Streptococcus pyogenes* infection in mice: underlying immune dysfunction and strategy to enhance immunity. *The Journal of pathology.* 2010;220(5):521-9.
36. Yuste J, Ali S, Sriskandan S, Hyams C, Botto M, Brown JS. Roles of the alternative complement pathway and C1q during innate immunity to *Streptococcus pyogenes*. *Journal of immunology.* 2006;176(10):6112-20.
37. Yuste J, Sen A, Truedsson L, Jonsson G, Hyams C, Cohen JM, et al. Impaired opsonization with complement and phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* in sera from subjects with inherited C2 deficiency. *Microbes and infection / Institut Pasteur.* 2010;12(8-9):626-34.

38. Medina E, Goldmann O, Rohde M, Lengeling A, Chhatwal GS. Genetic control of susceptibility to group A streptococcal infection in mice. *The Journal of infectious diseases*. 2001;184(7):846-52.
39. Goldmann O, Chhatwal GS, Medina E. Immune mechanisms underlying host susceptibility to infection with group A streptococci. *The Journal of infectious diseases*. 2003;187(5):854-61.
40. Group A streptococcal vaccine development: current status and issues of relevance to less developed countries. World Health Organization, 2005.
41. Van Howe RS, Kusnier LP, 2nd. Diagnosis and management of pharyngitis in a pediatric population based on cost-effectiveness and projected health outcomes. *Pediatrics*. 2006;117(3):609-19.
42. Pfoh E, Wessels MR, Goldmann D, Lee GM. Burden and economic cost of group A streptococcal pharyngitis. *Pediatrics*. 2008;121(2):229-34.
43. Gerber MA, Brown HW, Lee G, Tanz RR, Temte JL, Van Beneden CA. Physicians' opinions about critical attributes of a potential group A streptococcal vaccine. *Vaccine*. 2010;28(44):7155-60.
44. Steer AC, Batzloff MR, Mulholland K, Carapetis JR. Group A streptococcal vaccines: facts versus fantasy. *Current opinion in infectious diseases*. 2009;22(6):544-52.
45. Ji Y, Carlson B, Kondagunta A, Cleary PP. Intranasal immunization with C5a peptidase prevents nasopharyngeal colonization of mice by the group A *Streptococcus*. *Infection and immunity*. 1997;65(6):2080-7.
46. Park HS, Cleary PP. Active and passive intranasal immunizations with streptococcal surface protein C5a peptidase prevent infection of murine nasal mucosa-associated lymphoid tissue, a functional homologue of human tonsils. *Infection and immunity*. 2005;73(12):7878-86.
47. Guzman CA, Talay SR, Molinari G, Medina E, Chhatwal GS. Protective immune response against *Streptococcus pyogenes* in mice after intranasal vaccination with the fibronectin-binding protein SfbI. *The Journal of infectious diseases*. 1999;179(4):901-6.
48. Penfound TA, Chiang EY, Ahmed EA, Dale JB. Protective efficacy of group A streptococcal vaccines containing type-specific and conserved M protein epitopes. *Vaccine*. 2010;28(31):5017-22.
49. Postol E, Alencar R, Higa FT, Freschi de Barros S, Demarchi LM, Kalil J, et al. StreptInCor: a candidate vaccine epitope against *S. pyogenes* infections induces protection in outbred mice. *PLoS one*. 2013;8(4):e60969.
50. De Amicis KM, Freschi de Barros S, Alencar RE, Postol E, Martins Cde O, Arcuri HA, et al. Analysis of the coverage capacity of the StreptInCor candidate vaccine against *Streptococcus pyogenes*. *Vaccine*. 2014;32(32):4104-10.
51. Hu MC, Walls MA, Strop SD, Reddish MA, Beall B, Dale JB. Immunogenicity of a 26-valent group A streptococcal vaccine. *Infection and immunity*. 2002;70(4):2171-7.
52. Bisno AL, Rubin FA, Cleary PP, Dale JB, National Institute of A, Infectious D. Prospects for a group A streptococcal vaccine: rationale, feasibility, and obstacles--report of a National Institute of Allergy and Infectious Diseases workshop. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;41(8):1150-6.
53. McNeil SA, Halperin SA, Langley JM, Smith B, Warren A, Sharratt GP, et al. Safety and immunogenicity of 26-valent group a *Streptococcus* vaccine in healthy adult volunteers. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;41(8):1114-22.
54. McMillan D. StreptAvax (ID Biomedical). *Current opinion in investigational drugs*. 2006;7(2):186-90.

55. Wozniak A, Rojas P, Rodriguez C, Undabarrena A, Garate C, Riedel I, et al. M-protein genotype distribution and hyaluronic acid capsule in group A *Streptococcus* clinical isolates in Chile: association of emm gene markers with csrR alleles. *Epidemiol Infect.* 2012;140(7):1286-95.
56. Hall MA, Stroop SD, Hu MC, Walls MA, Reddish MA, Burt DS, et al. Intranasal immunization with multivalent group A streptococcal vaccines protects mice against intranasal challenge infections. *Infection and immunity.* 2004;72(5):2507-12.
57. McLellan DG, Chiang EY, Courtney HS, Hasty DL, Wei SC, Hu MC, et al. Spa contributes to the virulence of type 18 group A streptococci. *Infection and immunity.* 2001;69(5):2943-9.
58. Bueno SM, Gonzalez PA, Cautivo KM, Mora JE, Leiva ED, Tobar HE, et al. Protective T cell immunity against respiratory syncytial virus is efficiently induced by recombinant BCG. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008;105(52):20822-7.
59. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. World Health Organization, 2005 927.
60. Ross M, Pawlina W. Aparato respiratorio. *Histología Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular.* Madrid: PANAMERICANA; 2007. p. 678-83.
61. Skinner JM, Caro-Aguilar IC, Payne AM, Indrawati L, Fontenot J, Heinrichs JH. Comparison of rhesus and cynomolgus macaques in a *Streptococcus pyogenes* infection model for vaccine evaluation. *Microbial pathogenesis.* 2011;50(1):39-47.
62. Siegert J, Sastalla I, Chhatwal GS, Medina E. Vaccination equally enables both genetically susceptible and resistant mice to control infection with group A streptococci. *Microbes and infection / Institut Pasteur.* 2006;8(2):347-53.
63. Fluckiger U, Jones KF, Fischetti VA. Immunoglobulins to group A streptococcal surface molecules decrease adherence to and invasion of human pharyngeal cells. *Infection and immunity.* 1998;66(3):974-9.
64. Trudel L, St-Amand L, Bareil M, Cardinal P, Lavoie MC. Bacteriology of the oral cavity of BALB/c mice. *Canadian journal of microbiology.* 1986;32(8):673-8.
65. Technical Guide for ELISA. In: SeraCare, editor. 2013.
66. Kogot JM, Sarkes DA, Val-Addo I, Pellegrino PM, Stratis-Cullum DN. Increased affinity and solubility of peptides used for direct peptide ELISA on polystyrene surfaces through fusion with a polystyrene-binding peptide tag. *BioTechniques.* 2012;52(2):95-102.
67. Fischetti VA NR, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI. Genetics of Lactococci. *Gram-Positive Pathogens.* Washington, DC: ASM Press; 2000. p. 295-306.
68. Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, Kilpper-Bälz R, Collins MD, Fischer W. Transfer of *Streptococcus lactis* and Related Streptococci to the Genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology.* 1985;6(2):183-95.
69. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews.* 2009;22(2):240-73, Table of Contents.
70. Elson G, Dunn-Siegrist I, Daubeuf B, Pugin J. Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Blood.* 2007;109(4):1574-83.
71. Mannam P, Jones KF, Geller BL. Mucosal vaccine made from live, recombinant *Lactococcus lactis* protects mice against pharyngeal infection with *Streptococcus pyogenes*. *Infection and immunity.* 2004;72(6):3444-50.
72. Feierabend D, Reichart R, Romeike B, Kalff R, Walter J. Cerebral abscess due to *Lactococcus lactis* cremoris in a child after sinusitis. *Clinical neurology and neurosurgery.* 2013;115(5):614-6.
73. Lee JY, Seo MY, Yang J, Kim K, Chang H, Kim SC, et al. Polymicrobial Peritonitis with *Lactococcus lactis* in a Peritoneal Dialysis Patient. *Chonnam medical journal.* 2014;50(2):67-9.

74. Lin KH, Sy CL, Chen CS, Lee CH, Lin YT, Li JY. Infective endocarditis complicated by intracerebral hemorrhage due to *Lactococcus lactis* subsp. cremoris. *Infection*. 2010;38(2):147-9.
75. Guz G, Yegin ZA, Dogan I, Hized K, Bali M, Sindel S. Portal vein thrombosis and liver abscess due to *Lactococcus lactis*. *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology*. 2006;17(2):144-7.
76. General Recommendations on Immunization. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Centers for Disease Control and Prevention; 2011.