

29
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

RESPUESTA HUMORAL A EXTRACTOS DE
Streptococcus pyogenes AISLADOS DE PACIENTES
CON FIEBRE REUMATICA Y SUS CONTACTOS
FAMILIARES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

AIDA ARACELI GARCIA NUÑEZ

ASESORES:

DRA. SILVIA GIONO CEREZO

M. EN CIENCIAS J. FRANCISCO RETA MARES

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

	PAGINA
Resumen -----	1
Introducción -----	3
Hipótesis general -----	18
Objetivos particulares -----	18
Esquema General -----	20
Materiales y Metodos -----	21
Resultados -----	40
Discusión -----	76
Conclusiones -----	81
Apéndice -----	92
Bibliografía -----	96

INDICE DE TABLAS

	PAGINA
TABLA 1.- Tipo de enfermedades causadas por <i>S. pyogenes</i> .	5
TABLA 2.- Criterios de Jones, Mayores y menores para el Diagnóstico de la Fiebre Reumática.	8
TABLA 3.- Productos extracelulares de <i>S. pyogenes</i>	9
TABLA 4.- Relación de cepas y sueros de pacientes con Fiebre Reumática	22
TABLA 5.- Relación de cepas y sueros de Contactos Familiares de pacientes con Fiebre Reumática	23
TABLA 6.- Cepas a las que se les realizó extracción de Proteína M.	28
TABLA 7.- Patrones de bandas de electroforésis y de Inmunolectrotransferencia.	71

INDICE DE FIGURAS

	PAGINA
FIGURA 1: COMPONENTES CELULARES DE <i>S. pyogenes</i> .	10
FIGURA 2: ESTRUCTURA DE LA PROTEINA M.	12
FIGURA 3: MODELO PROPUESTO DE LA PROTEINA M6.	13
FIGURA 4: CRUCE ANTIGENICO DE LAS ESTRUCTURAS SUPERFICIALES DE <i>S. pyogenes</i> Y DIVERSOS TEJIDOS HUMANOS.	18
FIGURA 5: POSICION DE CADA UNA DE LAS PARTES DEL "CASSETTE" PARA TRANSFERENCIA.	37
FIGURA 6: PATRON ELECTROFORETICO DE UNA CEPA DE <i>S. pyogenes</i> EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 12.5%. (PROCESO DE ESTANDARIZACION)	41
FIGURA 7: PATRON ELECTROFORETICO DE UNA CEPA DE <i>S. pyogenes</i> EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 15.5%. (PROCESO DE ESTANDARIZACION)	42
FIGURA 8: PATRON ELECTROFORETICO DE UNA CEPA DE <i>S. pyogenes</i> EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 16.6%. (PROCESO DE ESTANDARIZACION)	43
FIGURA 9: PATRON ELECTROFORETICO EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE MUESTRAS DE UNA CEPA DE <i>S. pyogenes</i> PREPARADAS CON SOLUCION SALINA A DIFERENTES D.O. (PROCESO DE ESTANDARIZACION).	45

- FIGURA 10: PATRON ELECTROFORETICO EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE UNA CEPA DE *S. pyogenes* A DIFERENTES TIEMPOS DE HERVIDO. (PROCESO DE ESTANDARIZACION). 46
- FIGURA 11: PATRON ELECTROFORETICO EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE CEPAS DE *S. pyogenes* AISLADAS DE PACIENTES CON FIEBRE REUMATICA Y SUS CONTACTOS FAMILIARES. 49
- FIGURA 12: PATRON ELECTROFORETICO EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE CEPAS DE *S. pyogenes* AISLADAS DE CONTACTOS FAMILIARES DE PACIENTES CON FIEBRE REUMATICA. 51
- FIGURA 13: PATRON ELECTROFORETICO EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE CEPAS DE *S. pyogenes* AISLADAS DE CONTACTOS FAMILIARES DE PACIENTES CON FIEBRE REUMATICA. 52
- FIGURA 14: PATRON ELECTROFORETICO EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE EXTRACTOS CRUDOS DE PROTEINA M DE *S. pyogenes* AISLADOS DE PACIENTES CON FIEBRE REUMATICA Y SUS CONTACTOS FAMILIARES. 54
- FIGURA 15: PATRON ELECTROFORETICO EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE EXTRACTOS CRUDOS DE PROTEINA M DE *S. pyogenes* AISLADOS DE PACIENTES CON FIEBRE REUMATICA Y SUS CONTACTOS FAMILIARES. 55
- FIGURA 16: INMUNOTRANSFERENCIA DE UNA CEPA DE *S. pyogenes*. (ESTANDARIZACION DE LA DILUCION DEL SUERO). 57
- FIGURA 17: INMUNOTRANSFERENCIA DE UNA CEPA DE *S. pyogenes*. (ESTANDARIZACION DE LA DILUCION DEL CONJUGADO DE FOSFATSA ALCALINA). 58

FIGURA 18: INMUNOTRANSFERENCIA DE CEPAS DE <i>S. pyogenes</i> AISLADAS DE PACIENTES CON FIEBRE REUMÁTICA Y SUS CONTACTOS FAMILIARES.	59
FIGURA 19: INMUNOTRANSFERENCIA DE CEPAS DE <i>S. pyogenes</i> AISLADAS DE PACIENTES CON FIEBRE REUMÁTICA.	61
FIGURA 20: INMUNOTRANSFERENCIA DE CEPAS DE <i>S. pyogenes</i> AISLADAS DE CONTACTOS DE LA FAMILIA 53.	63
FIGURA 21: INMUNOTRANSFERENCIA DE CEPAS DE <i>S. pyogenes</i> AISLADAS DE CONTACTOS DE LA FAMILIA 69.	64
FIGURA 22: INMUNOTRANSFERENCIA DE CEPAS DE <i>S. pyogenes</i> AISLADAS DE CONTACTOS DE LA FAMILIA 61.	65
FIGURA 23: INMUNOTRANSFERENCIA DE CEPAS DE <i>S. pyogenes</i> AISLADAS DE CONTACTOS DE LA FAMILIA 54.	66
FIGURA 24: INMUNOTRANSFERENCIA DE CEPAS DE <i>S. pyogenes</i> AISLADAS DE UN PACIENTE CON FIEBRE REUMÁTICA Y SU CORRESPONDIENTE CONTACTO FAMILIAR. (FAMILIA 80).	67
FIGURA 25: INMUNOTRANSFERENCIA DE CEPAS DE <i>S. pyogenes</i> AISLADAS DE UN PACIENTE CON FIEBRE REUMÁTICA Y SU CORRESPONDIENTE CONTACTO FAMILIAR. (FAMILIA 53)	68
FIGURA 26: INMUNOTRANSFERENCIA DE EXTRACTOS DE PROTEINA M DE CEPAS DE <i>S. pyogenes</i> AISLADAS DE PACIENTES CON FIEBRE REUMÁTICA Y SUS CONTACTOS FAMILIARES. (FAMILIAS 53 Y 80).	70

GLOSARIO

Ac = Anticuerpo

Ag = Antígeno

Ag-Ac = Unión Antígeno-Anticuerpo

C.F = Contactos familiares

D.O = Densidad óptica

F.R. = Fiebre Reumática

GNA = Glomerulonefritis aguda

IET = Inmunolectrotransferencia

MARC. P.M = Marcadores de peso molecular

P.E = Patrón electroforético

Pep = Extracto de proteína M realizado con la enzima
pepsina.

P.M = Peso Molecular

Pl-M = Proteína M

S.S.E = Solución Salina Estéril

TN = TESTIGOS NEGATIVOS

RESUMEN

Los estreptococos microscópicamente se describen como cocos Gram positivos esféricos u ovoides agrupados en cadenas. Son catalasa y oxidasa negativos.

El *Streptococcus pyogenes* juega un papel importante en el desarrollo de la F.R, la cuál se define como una secuela no supurativa de una infección de las vías respiratorias altas por este microorganismo.

La importancia clínica de la enfermedad es el efecto potencialmente letal sobre el corazón, que ocurre durante la miocarditis reumática.

Se ha establecido que la proteína M de *S. pyogenes* es la responsable de la producción de anticuerpos tipo específicos, base de la inmunidad en el hombre; sin embargo también presenta determinantes antigénicos que estimulan la formación de anticuerpos de reacción cruzada con tejido cardíaco y esquelético.

Se piensa que existen mecanismos inmunológicos involucrados en la patogenia de la F.R, ya que existe un período de latencia de 3 semanas entre la infección faríngea y el desarrollo de la enfermedad, además de una respuesta inmune aumentada en pacientes con F.R hacia antígenos de estreptococo, en comparación con la población

que presenta solo infección faríngea por este microorganismo.

El propósito del trabajo fue demostrar mediante IET la existencia de una respuesta humoral diferente entre pacientes con F.R y C.F sin la enfermedad, hacia antígenos de cepas completas de *S. pyogenes* y extractos crudos de su Pt-M.

Si observamos una respuesta humoral diferente entre ambos casos: En el caso de los extractos de cepas completas, a) los pacientes con F.R reconocieron un menor número de antígenos de *S. pyogenes* comparado con los C.F.; b) los C.F reconocieron una "doble banda" de P.M aproximado de 45 y 48 KDa mientras que los pacientes con F.R solo reconocieron a una de estas 2 bandas, c) los pacientes con F.R reconocieron a una banda de P.M de 66 KDa y solo un bajo porcentaje de los C.F reconocieron esta misma banda. Con respecto a los extractos crudos de Pt-M, no observamos reconocimiento de las bandas de P.M de 10-30 KDa por el suero de pacientes con F.R, pero sí el de bandas de P.M de 30-45 KDa. Por lo que sugerimos que puede existir un estado de supresión en la respuesta de anticuerpos en los pacientes con F.R hacia antígenos de estreptococo y posiblemente los fragmentos de la Pt-M de bajo P.M pueden contener los epitopos protectores.

INTRODUCCION:

El estreptococo forma parte del grupo de bacterias conocidas como piógenas junto con neumococo y estafilococo. Microscópicamente se describen como cocos Gram positivos esféricos u ovoides agrupados en cadenas que se dividen en plano perpendicular al eje de la misma. Es microaerofílico, catalasa y oxidasa negativo (33).

Los estreptococos requieren de medios ricos para su crecimiento, siendo el más utilizado la gelosa sangre, en donde es capaz de producir hemólisis, propiedad que fué aprovechada en 1919 por Brown para dividirlos en tres categorías:

- Estreptococos hemolíticos
- Estreptococos β hemolíticos
- Estreptococos γ hemolíticos

El estreptococo β hemolítico presenta tres clases de colonias: mucoides, mate y lustrosas (33, 18).

Através de los esfuerzos pioneros de Lancefield y colaboradores, se reconocieron los patrones de la estructura antigénica del estreptococo β hemolítico, demostrándose la presencia de antígenos específicos de grupo y especie de estos microorganismos; surge así la clasificación de Lancefield que va del grupo A al T; basada en el tipo de

carbohidrato C, un polisacárido localizado en la pared celular del microorganismo, diferente y específico para cada grupo. La especificidad antigénica, está dada por el residuo terminal del azúcar unido a la ramosa, siendo para el estreptococo grupo A la N-Acetil glucosamina (33).

Los estreptococos grupo A, incluyen a *Streptococcus pyogenes* como única especie, estos microorganismos son β hemolíticos y los únicos sensibles a bacitracina (33).

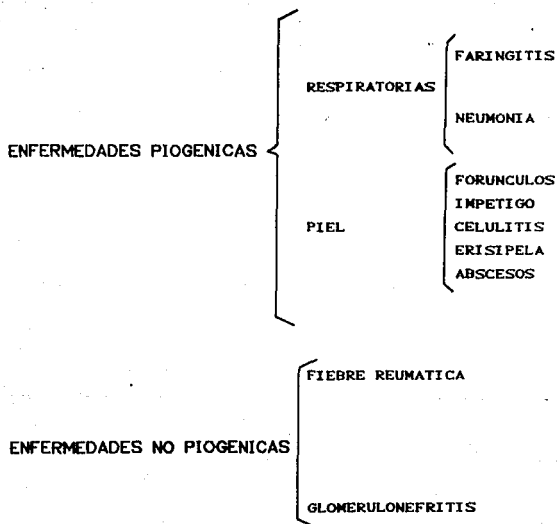
Se ha encontrado que la mayoría de las cepas causantes de infecciones en el hombre pertenecen al grupo A de Lancefield (33, 17).

Las enfermedades que puede causar *Streptococcus pyogenes* en el hombre se han clasificado en dos grupos (TABLA 1) (17, 9)

Streptococcus pyogenes juega un papel muy importante en el desarrollo de la Fiebre Reumática, la cuál se define como una secuela no supurativa de una infección de las vías respiratorias altas por este microorganismo, que afecta el tejido conectivo de varias partes del organismo, como el existente en piel, articulaciones, cerebro, arterias y corazón (17, 38).

Se sabe que del 3 al 5% de individuos que sufren una infección faríngea por *Streptococcus pyogenes* no

**TABLA 1: TIPO DE ENFERMEADES CAUSADAS POR
*S. pyogenes***



tratada ó ineficazmente tratada, desarrollan Fiebre Reumática y enfermedades posteriores como alteraciones cardiacas, lo cuál representa uno de los principales problemas de salud pública en la población infantil de varias ciudades del mundo, incluyendo la Ciudad de México (1).

El cuadro clínico de la Fiebre Reumática es complejo; se presenta por brotes de actividad inflamatoria sistémica que se localizan de preferencia en el corazón, articulaciones, núcleos de la base del cerebro, piel y tejido subcutáneo. Estos brotes son autolimitados y su duración puede ser de 6 a 16 semanas. La edad en que se presenta el brote es variable, pero generalmente ocurre entre los 2 y 21 años, el mayor número de ellos se observa entre los 8 y 13 años (1).

No se han encontrado diferencias significativas en cuanto al sexo, aunque parece predominar más en el femenino. La enfermedad se presenta en cualquier época del año (34, 1).

Laurence (1922), observó que la incidencia de Fiebre Reumática se presentaba más frecuentemente en grupos familiares cerrados. Recientemente (1983, 1987) se ha reportado desde un 35 a 38% de individuos de población reumática que tuvieron antecedentes familiares de la

enfermedad (10).

El diagnóstico de Fiebre Reumática se simplifica al seguir los criterios de Jones (mayores y menores) (TABLA 2) (34, 1). Además de un título aumentado de las antiestreptolisinas "O" ó de otros anticuerpos estreptocócicos, cultivo faríngeo positivo ó antecedentes de escarlatina. La presencia de 2 manifestaciones mayores y de una menor ó de una mayor y 2 menores indican una alta probabilidad de Fiebre Reumática. La evidencia de una infección estreptocócica precedente, reafirma la posibilidad de Fiebre Reumática. Su ausencia podría hacer el diagnóstico dudoso, excepto en la Corea de Sydenham y en la carditis de larga duración (34, 1, 20).

Streptococcus pyogenes cuenta con factores de patogenidad que le permiten originar este tipo de enfermedades en el hombre; dentro de estos tenemos una gran cantidad de productos extracelulares (TABLA 3). Además cuenta con antígenos de superficie como lo son las proteínas M, R y T; Cápsula y Carbohidrato C (17). (FIGURA 1)

Se ha establecido que la proteína M de *Streptococcus pyogenes* es la responsable de la producción de anticuerpos tipo específicos base de la inmunidad en el hombre. Sin

**TABLA 2: CRITERIOS DE JONES, MAYORES Y MENORES
PARA EL DIAGNOSTICO
DE FIEBRE REUMATICA**

CRITERIOS MAYORES	CRITERIOS MENORES
<p>CARDITIS</p> <p>POLIARTRITIS</p> <p>COREA</p> <p>ERITEMA MARGINADO</p> <p>NODULOS SUBCUTA- NEOS</p>	<p>FIEBRE</p> <p>ARTRALGIAS</p> <p>FIEBRE REUMATICA PREVIA O PRESENCIA DE CARDIOPATIA REUMATICA.</p> <p>ERITROSEDIMENTACION ACELERADA</p> <p>PROTEINA C REACTIVA AUMENTADA</p> <p>LEUCOCITOSIS</p>

TABLA 3: PRODUCTOS EXTRACELULARES DE *S. pyogenes*

SUBSTANCIA O PRODUCTO	ANTIGENICIDAD	PROPIEDADES	UTILIDAD CLINICA O Dx
Estreptolisina O	+	Hemolizante, cardiotóxica	A. S. O + indica infección estreptocócica
Estreptolisina S	-	Hemolizante, cardiotóxica en animales	No tiene aplicación Dx.
Toxina eritrogénica	+	Produce el eritema de la escarlatina	No tiene aplicación Dx.
Desoxirribonucleasa	+	Produce Ac.	Gran aumento de Ac. en GNA
Nicotinamida-adenina dinucleotidasa	+	Produce Ac a proteínas A, B, C y D	En F. R permanecen elevados los Ac por más tiempo.
Hialuronidasa	+	Produce antihialuronidasa	Igual aplicación que para estreptolisina O.
Estreptocinasa	+	Activa plasminógeno en plasma	No es útil por dificultad de estandarización del Ac.
Proteínasa	+	Hidroliza Proteína M, cardiotóxico en animales.	No es útil en clínica.

AC = Anticuerpos
 GNA = Glomerulo Nefritis Aguda
 FR = Fiebre Reumática.

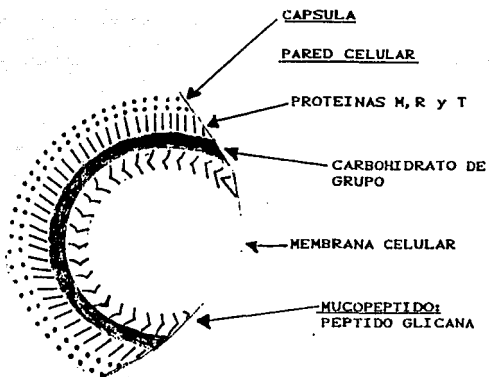


FIGURA 1: COMPONENTES CELULARES DE

S. pyogenes

embargo, también presenta determinantes antigénicos que estimulan la formación de anticuerpos de reacción cruzada con tejido cardíaco y esquelético. Debido a su profundo efecto antifagocítico, esta molécula sirve como el principal factor de virulencia del estreptococo, los cuales son eliminados del huésped infectado solo después de que se producen anticuerpos opsonicos tipo específicos hacia la proteína M (23).

Actualmente se acepta que la proteína M es una molécula dimerica que se extiende casi 60 nm desde la superficie de la célula estreptocócica como una fibra de dos cadenas superenrolladas; esta estructura resulta de la internalización de los residuos hidrofóbicos de dos cadenas alfa-hélice que se enredan una alrededor de la otra (35).

El extremo amino terminal de la molécula se encuentra hacia el exterior, mientras que el extremo carboxilo terminal se encuentra unido a la peptidoglicana por enlaces no covalentes y finalmente anclado en la membrana de la bacteria (16). (FIGURA 2)

El segmento amino terminal juega un papel importante en la actividad biológica de la molécula ya que los anticuerpos generados contra esta región opsonizan a los estreptococos del tipo M del cual se derivaron (3, 4, 8). (FIGURA 3)

Estudios con anticuerpos monoclonales a la proteína M G nativa e hibridización de DNA, indican que la región amino

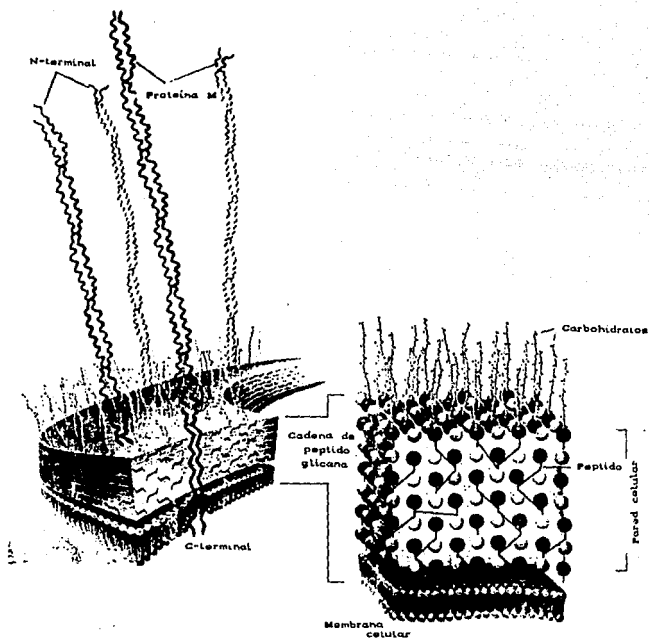


FIGURA 2: ESTRUCTURA DE LA PROTEINA M: EN EL LADO IZQUIERDO SE OBSERVA LA ESTRUCTURA DE LA PROTEINA M EN LA SUPERFICIE DEL ESTREPTOCOCO, Y EN EL LADO DERECHO LA REGION EN DONDE SE UNE A LA MEMBRANA CELULAR Y SU ESTABILIZACION EN LA PARED CELULAR.

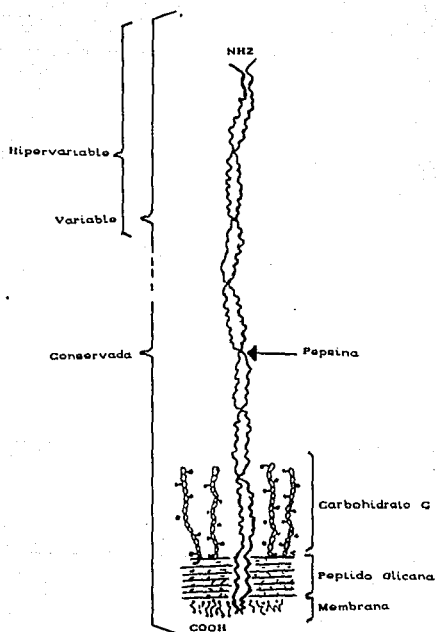


FIGURA 3-

MODELO PROPUESTO DE LA PROTEINA
M6. LA PORCION HELICOIDAL SE EXTIENDE
APROXIMADAMENTE 60 nm DE LA
PARED CELULAR.

Además de sus epitopos protectores, ciertas moléculas de proteína M contienen epitopos capaces de originar reacciones autoinmunes con tejido cardíaco del huesped (6).

Cada día cobra más fuerza la noción de que hay antígenos comunes entre el estreptococo y los tejidos que resultan lesionados en el paciente con Fiebre Reumática (FIGURA 4). Esta similitud se da entre:

- Proteína M con sarcolema de fibra cardíaca
- Carbohidrato específico de grupo (N - acetil - glucosamina) con glucoproteínas de las válvulas.
- Constituyentes de la membrana de estreptococo con sarcolema y miosina.

Esta similitud ó mimetismo molecular puede ser clave en la patogénesis de la Fiebre Reumática pudiendo explicar la asociación entre infección estreptocócica y carditis subsecuente (6).

La Fiebre Reumática persiste como un problema de salud pública no solo en los países del tercer mundo, sino también en países con alto grado de desarrollo económico (39, 4). En las décadas de los cuarentas, cincuentas, sesentas y setentas, la Fiebre Reumática junto con sus complicaciones como la cardiopatía reumática y las secuelas de esta eran una

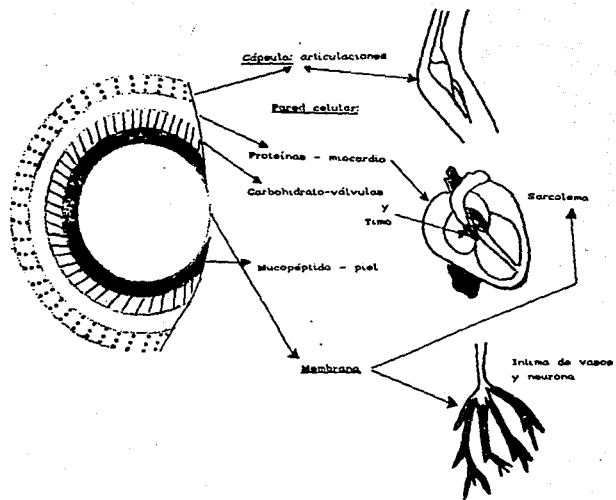


FIGURA 4: Cruce antigénico de las estructuras superficiales de *S. pyogenes* y diversos tejidos humanos.

terminal de esta molécula es variable entre los serotipos M, mientras que la mitad carboxilo terminal es conservada (22, 18). Otros estudios han sugerido, que la región amino terminal de la proteína M, contienen los determinantes tipo específicos opsonogénicos de esta molécula (18, 23), que estarían presentes en el antígeno extraído con pepsina.

Se piensa que hay mecanismos inmunológicos involucrados en la patogenia de la Fiebre Reumática debido a:

- a. Hay período de latencia de 3 semanas entre la infección faríngea y el desarrollo de Fiebre Reumática; tiempo necesario para que se desarrolle una respuesta de tipo inmunológico.
- b. Existe una respuesta inmune aumentada hacia antígenos de estreptococo en pacientes con Fiebre Reumática en comparación con la población que presenta infección faríngea por este microorganismo, pero que no desarrolla Fiebre Reumática.
- c. Gran incidencia de recurrencias de Fiebre Reumática en relación aparente con nuevos episodios de infección estreptocócica (8).

de las causas más frecuentes de invalidez y muerte en las primeras décadas de la vida (34). Sin embargo en México se presentó en la década de los ochentas una reducción de la incidencia de la enfermedad así como de la cardiopatía reumática, de tal manera que para el año de 1987 no se registró una sola defunción por este padecimiento (5, 30).

Cabe mencionar que en la década presente tanto en Europa como en el Norte de América se da el resurgimiento de esta enfermedad (37, 6, 11).

Es obvio que desde hace mucho tiempo existe la necesidad de contar con una vacuna contra el estreptococo, con objeto de prevenir la Fiebre Reumática, sin embargo su desarrollo se ha retrasado porque los anticuerpos contra la proteína M que ofrecen protección contra la infección subsecuente, tienen también la característica de ser de reacción cruzada con tejido cardíaco (6).

El uso de péptidos sintéticos favorece la respuesta de anticuerpos tipo específicos sin reacción cruzada con tejido del huésped, siendo una de las posibles alternativas para la creación de una vacuna polivalente.

Se sigue haciendo investigación al respecto, esperando que en un futuro próximo se disponga de la vacuna antiestreptocócica.

HIPOTESIS DE TRABAJO

La respuesta humoral hacia extractos de cepas completas de *Streptococcus pyogenes* y extractos de su proteína M, es diferente entre pacientes con Fiebre Reumática y contactos familiares infectados por *Streptococcus pyogenes*, pero que no desarrollan la enfermedad.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Ensayar la preparación de las muestras de extractos de cepas completas de *Streptococcus pyogenes* para su corrimiento electroforético.

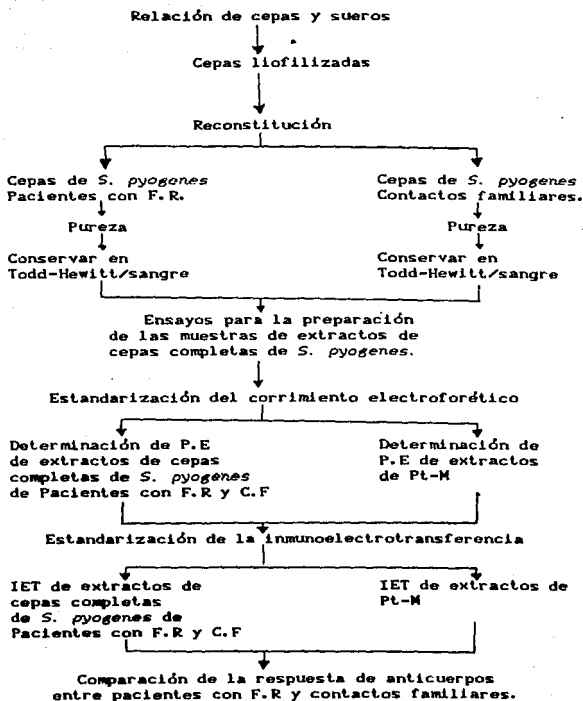
- Obtener los extractos de proteína M de los microorganismos aislados de casos en los que se cuenta tanto con cepa de paciente como de contacto de una misma familia.

- Realizar la estandarización de la técnica de electroforesis e inmunoelectrotransferencia, aplicadas a extractos de cepas completas de *Streptococcus pyogenes* y extractos de su proteína M.

- Hacer el corrimiento electroforético e inmunoelectrotransferencia de cada uno de los extractos de cepas completas de *Streptococcus pyogenes* y de los extractos de proteína M.

- Comparar la respuesta de anticuerpos entre pacientes con Fiebre Reumática y contactos familiares.

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO:



MATERIALES Y METODOS

CEPAS Y SUEROS:

Se trabajó con 5 cepas de *S. pyogenes* aisladas de pacientes con Fiebre Reumática (F.R), diagnosticada según los criterios de Jones (1) que acudieron a consulta interna en el Instituto Nacional de Pediatría (INP). Además de 10 cepas del mismo microorganismo aisladas de contactos familiares (C.F).

Se trabajó también con 4 sueros de pacientes y con 13 de contactos familiares (TABLAS 4 Y 5). Las cepas y sueros de pacientes se designaron con un número, mientras que los de contactos llevan además una letra minúscula; las cepas ó sueros de una misma familia se identifican con el mismo número.

RECONSTITUCION Y CONSERVACION DE LAS CEPAS LIOFILIZADAS Y VERIFICACION DE SU PUREZA.

Las cepas se reconstituyeron con caldo Todd-Hewitt, se sembraron en Agar Sangre al 5% y se incubaron a 37°C por 18-24 horas. A las colonias obtenidas se les realizaron las siguientes pruebas:

- Observación de morfología colonial

**TABLA 4: RELACION DE CEPAS Y SUEROS DE PACIENTES
CON FIEBRE REUMATICA.**

CEPAS DE PACIENTES	TIPIFICACION	SUEROS DE PACIENTES
C 40	M8.T8	S 40
C 45	M2.T2	S 45
C 80	M-Nt, T 12	S 80
C 53	M-Nt, TB3264	S 53
C 68	M-Nt, TB3264	*

NOTA: Solo las muestras que tienen su suero correspondiente fueron transferidas.

* No se tomo muestra de sangre en estos casos.
C= Cepa
S= Suero.

**TABLA 5: RELACION DE CEPAS Y SUEROS DE CONTACTOS
FAMILIARES DE PACIENTES CON
FIEBRE REUMATICA**

CEPAS DE C. FAM.	TIPIFICACION	SUEROS DE C. FAM.
C 80a	M-Nt, T 12	S 80a
C 53a	M-Nt, TB3264	S 53a
C 53b	M-NT, TB3264	S 53b
C 61a	M55.T8	*
C 61b	M-Nt, T8	S 61b
C 61c	M-Nt, T8	S 61c
C 61d	M-Nt, T8	S 61d
C 61e	M-Nt, T8	S 61e
C 81a	M-Nt, T2	*
C 69a	M-Nt, TB3264	S 69a
C 69b	M-Nt, TB3264	S 69b
C 69c	M-Nt, TB3264	*
C 44b	M-Nt, T2	S 44b
C 48a	M1.T1	*
C 49c	M12.T12	*
C 52a	M14.T14	*
C 54a	M-Nt, T8	S 54a
C 54b	M-Nt, T8	S 54b
C 54c	M-Nt, T8	S 54c

* No se tomo muestra de sangre en estos casos.

C= Cepa

S= Suero

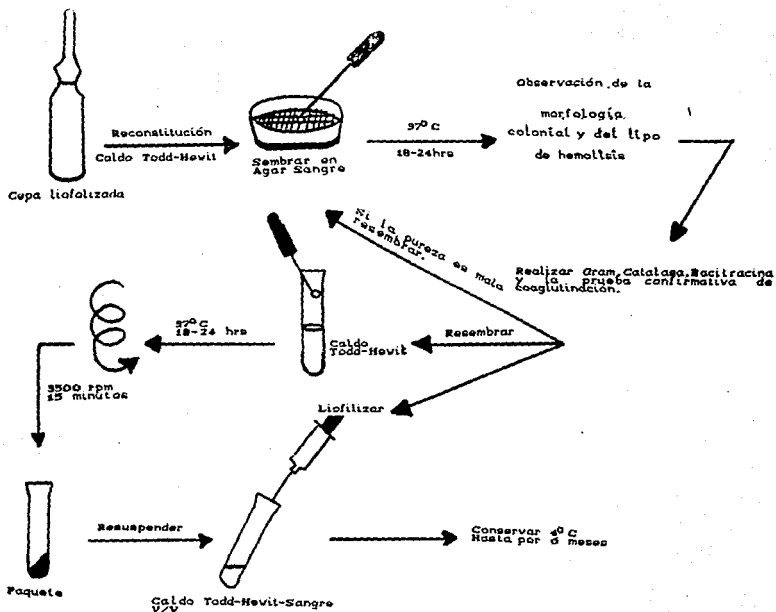
NOTA: Solo las cepas que tienen su suero correspondiente fueron transferidas.

- Tipo de hemólisis
- Gram
- Catalasa
- Bacitracina
- Coagulación

Una vez confirmada la pureza de cada una de las cepas, se procedió a conservarlas en caldo Todd-Hewitt-sangre. (ESQUEMA 1)

PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE EXTRACTOS DE
CEPAS COMPLETAS DE *S. pyogenes*

Para la estandarización de la muestra, se preparó una suspensión de una cepa de *S. pyogenes* a las densidades ópticas de 0.8, 1.0, 1.5 y 2.0 a 540 nm en el Espectrofotómetro (Perkin-Elmer modelo 55-E), utilizando solución salina ó hepes. Esta misma cepa también se ajustó a una densidad óptica de 1.2 - 1.3 y se sonicó hasta obtener una densidad óptica de 0.2-0.3. Las muestras así preparadas se centrifugaron y el paquete se resuspendió en regulador de muestra 2X en una proporción de 50µl por cada ml de suspensión original y se hirvieron por 0, 15, 30 y 60 minutos. El patrón electroforético observado para cada una de



ESQUEMA 1: Determinación de la pureza de cada una de las cepas de *S. pyogenes* a trabajar y conservación de las mismas.

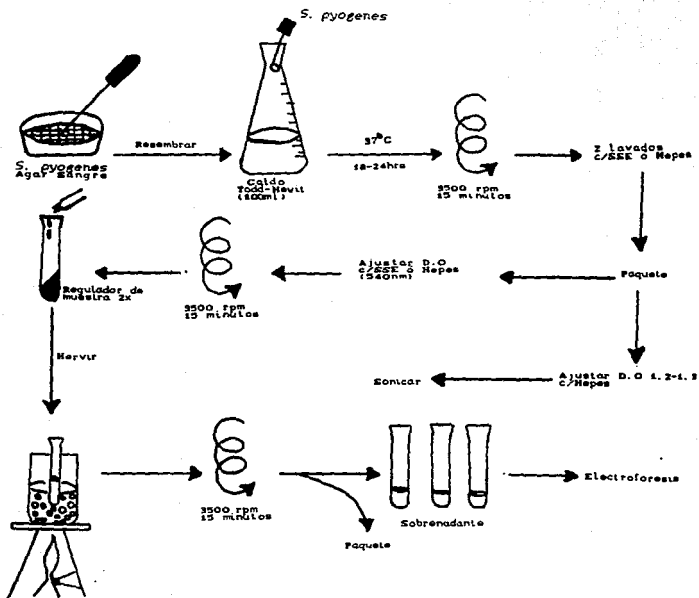
estas preparaciones permitió elegir el más adecuado para tratar a el resto de las cepas trabajadas. (ESQUEMA 2)

OBTENCION DE LOS EXTRACTOS DE PROTEINA M DE
S. pyogenes

Los extractos de proteína M se obtuvieron utilizando pepsina (SIGMA CHEMICAL Co., POTENCIA 1:10000) a pH de 5.8 de acuerdo a la técnica empleada por Manjula y Fischetti (32).

Las cepas a las que se les obtuvo proteína M se muestran en la tabla 6.

Las cepas se cultivaron en 5 litros de caldo Todd-Hewitt, adicionado con extracto de levadura al 1% durante 18 horas a 37°C; el cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos y se lavó dos veces en regulador de fosfatos 0.067M a pH 5.8. El paquete celular se resuspendió en el mismo regulador de extracción en una proporción de 2ml de regulador por gramo de bacteria y se agregó 1mg de pepsina por cada 10 gramos de bacteria y se incubó en baño María a 37°C por 45 minutos; la acción de la pepsina, se detuvo colocando el paquete celular en baño de



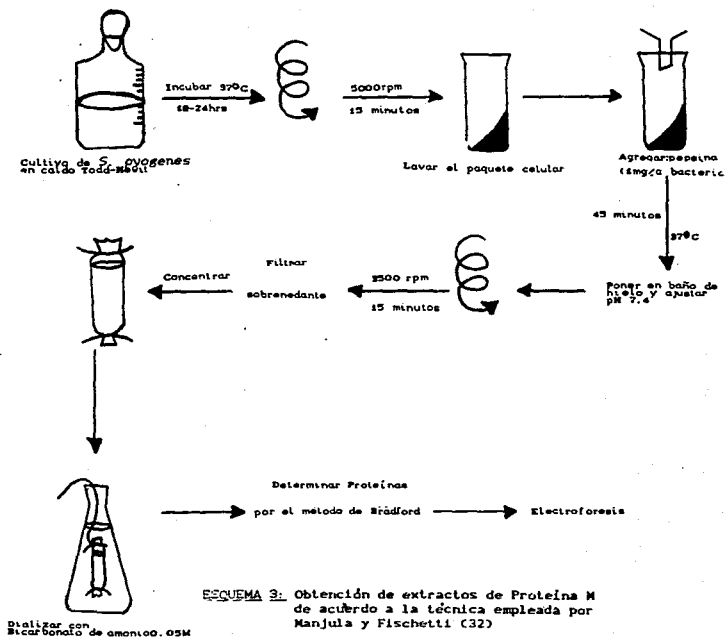
-27-

ESQUEMA 2: Preparación de las muestras de extractos de cepas completas de *S. pyogenes*.

**TABLA 9: CEPAS A LAS QUE SE LES REALIZO EXTRACCION
DE PROTEINA M**

PACIENTES	CONTACTOS FAMILIARES
C 80	C 80 a
C 53	C 53 a
	C 53 b
C 40	_____

NOTA: Solo se trabajó con los casos en los que se disponía de la cepa del paciente y su (s) respectivo (s) contactos familiares a excepción del C 40.



ESQUEMA 3: Obtención de extractos de Proteína M de acuerdo a la técnica empleada por Manjula y Fischetti (32)

hielo y ajustando el pH a 7.4 con bicarbonato de sodio al 7.5%. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos y el sobrenadante se pasó por un filtro Millipore de 0.2 μ m, se concentró a la quinta parte del volumen original y finalmente se dializó en bicarbonato de amonio 0.05M durante toda la noche. Una vez obtenido el extracto, se procedió a determinar concentración de proteínas por el método de Bradford (7). (ESQUEMA 3)

CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE EXTRACTOS DE CEPAS COMPLETAS DE S. pyogenes Y DE EXTRACTOS DE PROTEINA M

Este se realizó en la cámara para electroforesis (modelo SE 250 Hoefer Scientific Instruments) mediante el sistema discontinuo descrito por Laemmli (29).

- GEL SEPARADOR:

A) Para su preparación se utilizó una cámara de vaciado múltiple (modelo SE 275 Hoefer Scientific Instruments). Se lavan perfectamente una placa de vidrio y una de alúmina con detergente neutro. Se enjuagan con agua bidestilada y se sumergen en una solución de metanol al 5%, se secan con

algodón y se montan en la cámara para geles, de acuerdo a las instrucciones del mismo.

B) En un matraz Kitasato de 125ml se colocan los reactivos para la preparación del gel, para el cual se probaron concentraciones de 12.5, 15.5, 15.83 y 16.6% :

<u>REACTIVOS</u>	<u>CONCENTRACION DEL GEL</u>			
	<u>12.5%</u>	<u>15.5%</u>	<u>15.83%</u>	<u>16.6%</u>
			<u>ml/gel</u>	
- Soln. de monómeros	2.456	3.045	3.110	3.262
- Tris pH 8.8	1.5	1.5	1.5	1.5
- SDS 10%	0.12	0.12	0.12	0.12
- Agua bidestilada	1.944	1.354	1.289	1.138

VACIO/10 MIN.

- Persulfato de amonio al 10%	0.03	0.03	0.03	0.03
- TEMED	0.002	0.002	0.002	0.002

C) Se agita cuidadosamente para que no se hagan burbujas y se vierte la mezcla entre las dos placas, hasta una distancia de 2.5 cm del borde superior. Se coloca inmediatamente 0.2 ml de agua bidestilada sobre la superficie de la mezcla.

D) Se desmonta el gel, se inclina para remover el agua y

se lava la superficie del gel tres veces con agua bidestilada.

-GEL CONCENTRADOR:

E) Se remueve el líquido de la superficie del gel separador y se escurre bien. Se coloca el peine apropiado.

F) Se colocan en un matraz Kitasato los siguientes reactivos para la preparación del gel:

<u>REACTIVOS</u>	<u>ml/gel</u>
- Solución de monómeros	----- 0.33
- Tris 0.5M pH 8.8	----- 0.5
- SDS al 10%	----- 0.01
- Agua bidestilada	----- 1.22
VACIO/10 MIN.	
- Persulfato de amonio al 10%	----- 0.01
- TEMED	----- 0.001

Se agita cuidadosamente y se agrega la mezcla sobre el gel separador. Se acomoda el peine, de tal manera que no se formen burbujas en la interfase de los dos geles. La concentración que se utilizó para este gel fué del 5%. El grosor del gel y por consiguiente del peine fué de 1mm. Para

los extractos de cepas completas se usó peine de diez pozos, y para los extractos de proteína M de cinco pozos.

G) Se remueve el peine cuidadosamente y se enjuagan los canales con agua bidestilada cinco veces.

H) Se coloca el "cassette" en la cámara para electroforesis y se agrega el regulador de corrimiento.

I) Se colocaron las muestras utilizando una jeringa Hamilton. Los volúmenes de muestra probados para los extractos de cepas completas fueron de 10, 20 y 30 μ l. Para el caso de los extractos de proteína M, la concentración de proteína por pozo fue de 10 a 15 μ g.

En el primer pozo se colocó un volumen de 3 μ l de Marcadores de Peso Molecular (MW-SDS-200 SIGMA Chemical Co.) La jeringa se enjuaga 10 veces con SDS al 1% después de colocar cada muestra.

J) Se conectan los cables al aparato y a la fuente de poder (PS 500 XT Hoefer Scientific Instruments); se aplicaron 10mA de corriente constante en el gel concentrador y 20 mA en el separador por placa. Se mantiene la

corriente, hasta que el azul de bromofenol llegue a unos 0.2 cm del final de la placa.

K) Se desconecta el aparato, se desmonta el "cassette" y el gel se marca y se tinte con solución de azul de Coomassie al 0.125% en metanol-acetico-agua por 18-24 horas.

L) Se remueve el colorante y se agrega el decolorante I. Se hacen tantos cambios como sea necesario, hasta lograr la nitidez adecuada de las bandas; se agrega el decolorante II.

M) Se procede a secar los geles.

N) La determinación del peso molecular de las bandas de proteína se realizó por medio de la regresión lineal de la curva de calibración de los Marcadores de Peso Molecular e interpolando la movilidad relativa (Rf) de cada una de las bandas de interés en dicha curva. En la curva se grafica el log. del Peso Molecular de cada uno de los Marcadores (eje de las ordenadas) contra (Rf) en el (eje de las abscisas)

$$Rf = \frac{\text{DISTANCIA RECORRIDA EN EL GEL POR C/U DE LAS BANDAS}}{\text{DISTANCIA RECORRIDA POR EL FRENTE DE CORRIIMIENTO}}$$

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE EXTRACTOS DE CEPAS
COMPLETAS DE S. pyogenes Y DE LOS EXTRACTOS
DE PROTEINA M

1) TRANSFERENCIA:

A) Se corta un pedazo de 7 x 9 cm de papel de nitrocelulosa de 0.45 μ m de poro (SIGMA Chemical Co.).

B) Se coloca el papel en un recipiente que contenga 200ml de regulador de transferencia.

C) Se cortan 2 pedazos de 9 x 10 cm de papel filtro.

D) Se toma un "cassette" del aparato de electrotransferencia y se coloca la esponja humedecida en regulador de transferencia sobre el mismo. Sobre la esponja se coloca un pedazo de papel filtro igualmente humedecido y sobre este se coloca el papel de nitrocelulosa. Sobre el papel de nitrocelulosa se coloca el gel sin teñir y se tiene mucho cuidado de que no queden atrapadas burbujas entre el gel y el papel. Se hacen las marcas necesarias con un lápiz y se coloca el otro trozo de papel filtro sobre el gel y por último, una segunda esponja previamente humedecidos en

regulador de transferencia; se cierra el "cassette".

E) Se coloca el "cassette" en la cámara de transferencia y se conectan los electrodos de tal manera que el papel de nitrocelulosa quede orientado hacia el electrodo positivo. (FIGURA 5)

F) Se conectó el sistema a la fuente de poder. Las transferencias se realizaron por tres horas a 300 mA.

G) Al término de la transferencia se proceso para detectar las proteínas transferidas. Se corto el pedazo de papel donde estan los marcadores para ser teñidos con rojo de Ponceau así como un testigo para comprobar que sí hubo transferencia.

2) INMUNODETECCION:

A) El papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se colocó en un recipiente con 500ml de regulador de bloqueo y se incubó a 37°C por 1 hora.

B) Después del bloqueo se procedió a hacer 3 lavados de 5 minutos, uno con PBS Tween 0.1% y dos con PBS sin tween 20.

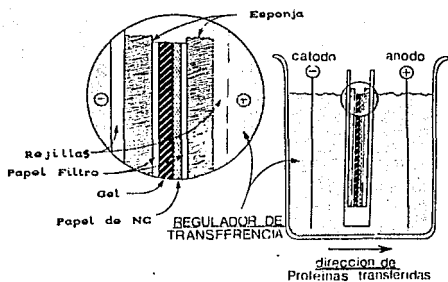


FIGURA 5: POSICION DE CADA UNA DE LAS PARTES DEL "CASSETE" PARA TRANSFERENCIA.

C) El papel de nitrocelulosa ya bloqueado se recubrió con 2ml de la dilución del suero problema en regulador de bloqueo. Se incubo por 1 hora a 37°C y toda la noche a 4°C. Se trabajó con un suero de paciente con Fiebre Reumática para la estandarización de la dilución del mismo; las diluciones ensayadas fueron 1:10, 1:25 y 1:50 y se probaron contra la cepa aislada del mismo paciente.

D) Se lavo con PHS tween 20 0.1% 10 veces 1 minuto cada vez.

E) Se agregaron 2 ml del conjugado de fosfatasa alcalina IgG de cabra anti IgG humana (BIO-RAD) y se incubo 1 hora a 37°C. El conjugado de fosfatasa alcalina se probó a las diluciones 1:2000, 1:3000, 1:4000 y 1:5000 en regulador de bloqueo.

F) Se hicieron 7 lavados de un minuto cada uno con PBS Tween 20 y después 10 lavados con PBS.

G) Se agregaron 2ml del sustrato de la Fosfatasa alcalina y se incubo 10 minutos ó hasta la aparición de las bandas. Se enjuaga muy bien con agua de la llave y se

deja secar.

Para el caso de los testigos negativos se siguió la misma técnica, con la diferencia de que las tiras de papel de nitrocelulosa no se trataron con el suero problema.

RESULTADOS

+ PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE EXTRACTOS DE CEPAS COMPLETAS DE S. pyogenes.

Para la preparación de las muestras, se trabajó con una sola cepa de *S. pyogenes* para la cuál se ensayaron tres técnicas:

- 1) Por el método de sonicación
- 2) Preparación de las muestras con Hepes
- 3) Preparación de las muestras con solución salina estéril (S.S.E)

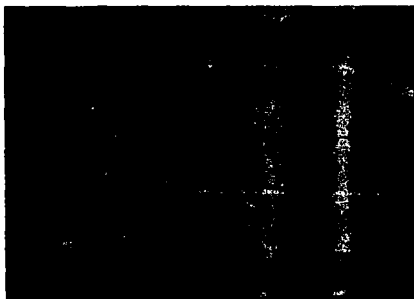
con el objeto de poder elegir la que mejor resolución presentara en el corrimiento electroforético.

- a) El método de sonicación dió buenos resultados en cuanto a resolución en geles de poliacrilamida, de concentración de 15.5% (FIGURAS 6, 7 y 8)
- b) La preparación de las muestras usando Hepes, no presentó buena resolución con ninguna de las densidades ópticas ensayadas, así como a ninguna concentración del gel separador (FIGURAS 6, 7 y 8)
- c) La preparación de las muestras usando S.S.E

FIGURA 6

PATRON ELECTROFORETICO DE UNA CEPA DE
S. pyogenes EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 12.5%

(PROCESO DE ESTANDARIZACION)



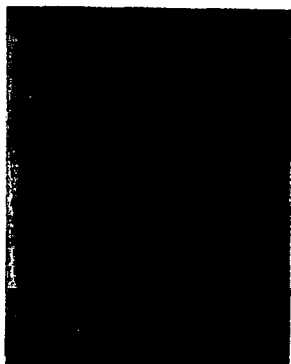
1	2	3	4	5	6
<u>CARRIL</u>		<u>D.O</u>		<u>VOL (μl)</u>	
1		0.8		10	HEPES
2		1.0		10	HEPES
3		1.5		10	HEPES
4		2.0		10	HEPES
5		1.2-1.3		10	SONICADO
6		1.2-1.3		20	SONICADO

NOTA: LAS MUESTRAS PREPARADAS POR SONICACION PRESENTAN MEJOR RESOLUCION EN SUS BANDAS

FIGURA 7

PATRON ELECTROFORETICO DE UNA CEPA DE
S. pyogenes EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 15.5%

(PROCESO DE ESTANDARIZACION)



<u>CARRIL</u>	<u>D.O</u>	<u>VOL. (μl)</u>	
1	1.0	20	HEPES
2	1.5	20	HEPES
3	2.0	20	HEPES
4	1.2-1.3	20	SONICADO

NOTA: SE OBSERVA MEJOR RESOLUCION POR EL METODO DE SONICACION.

FIGURA 8

PATRON ELECTROFORETICO DE UNA CEPA DE
S. pyogenes EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 16.6%

(PROCESO DE ESTANDARIZACION)



1 2 3 4

<u>CARRIL</u>	<u>D.O</u>	<u>VOL (μl)</u>	
1	1.2-1.3	20	SONICADO
2	2.0	20	HEPES
3	1.5	20	HEPES
4	1.0	20	HEPES

NOTA: SE OBSERVA MEJOR RESOLUCION POR EL METODO DE SONICACION.

dió buena resolución a una densidad óptica de 1.5 y a una concentración del gel separador del 15.5% (FIGURA 9).

La técnica por sonicación no pudo ser aplicada debido a la falta de disponibilidad del aparato, así como por el número elevado de muestras a trabajar; por lo que se eligió la técnica de preparación de muestras usando S.S.E.

Una vez elegida la técnica, se ensayaron tiempos de hervido de la muestra y volúmenes de la misma por pozo con el fin de afinar los resultados. Los tiempos de hervido que mejor resolución dieron, fueron los de 15 y 30 minutos (FIGURA 10), no observándose diferencias significativas en ellos, por lo que se eligió el de 15 minutos para tratar a el resto de las cepas. Tampoco hubo diferencias significativas en los volúmenes de muestra ensayados (FIGURA 9), por lo que se eligió el de 20 μ l.

† OBTENCION DE LOS EXTRACTOS DE PROTEINA M DE CEPAS DE *S. pyogenes*

Los extractos se obtuvieron de acuerdo a la técnica presentada en materiales y métodos. La concentración de proteínas de cada uno de los extractos, se determinó por el

FIGURA 9

PATRON ELECTROFORETICO EN GEL DE POLIACRILAMIDA
 DE MUESTRAS DE UNA CEPA DE *S. pyogenes*
 PREPARADAS CON SOLUCION SALINA A DIFERENTES D.O
 (PROCESO DE ESTANDARIZACION)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

<u>CARRIL</u>	<u>D.O</u>	<u>VOL (μl)</u>
1	1.0	10
2	1.0	20
3	1.0	30
4	-	-
5	1.5	10
6	1.5	20
7	1.5	30
8	2.0	10
9	2.0	20
10	2.0	30

* CONCENTRACION DEL GEL. 15.5M

NOTA: SE OBSERVA MEJOR RESOLUCION DE LAS BANDAS A D.O DE 1.5

FIGURA 10

PATRON ELECTROFORETICO EN GEL DE POLIACRILAMIDA
 DE UNA CEPA DE *S. pyogenes*
 A DIFERENTES TIEMPOS DE HERVIDO
 (PROCESO DE ESTANDARIZACION)



<u>CARRIL</u>	<u>D.O.</u>	<u>TIEMPO (MINUTOS)</u>
1	1.5	15
2	1.5	0
3	1.5	15
4	1.5	30
5	1.5	60
6	1.5	15
7	1.5	15 <i>S. typhi</i>

* CONCENTRACION DEL GEL. 45.5M

NOTA: SE OBSERVA MEJOR RESOLUCION DE LAS BANDAS A LOS TIEMPOS DE HERVIDO DE 15 Y 30 MINUTOS.

método de Bradford (7) y por medio de la regresión lineal de una curva patrón de albumina bovina (GRAFICA 1) e interpolando los valores de densidad óptica de cada uno de los extractos.

La concentración de proteína de cada uno de los extractos fué la siguiente:

PACIENTES

C 80 : 0.4126 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mta.

C 53 : 0.2714 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mta.

C 40 : 0.3908 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mta.

CONTACTOS FAMILIARES

C 80a : 0.5841 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mta.

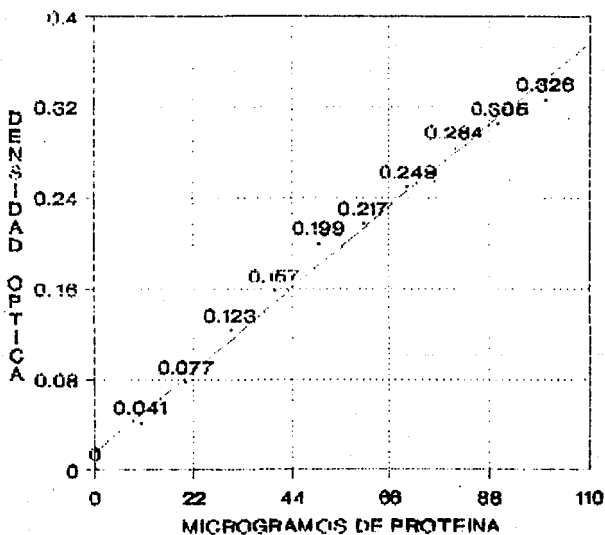
C 53a : 1.3631 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mta.

C 53b : 0.6175 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mta.

+ ELECTROFORESIS DE EXTRACTOS DE CEPAS COMPLETAS DE S. pyogenes.

Los patrones electroforéticos de las 5 cepas de pacientes reumáticos, localizadas en los carriles 2, 3, 4, 5 y 7 (FIGURA 11) no presentan diferencias importantes entre sí, a excepción de la cepa del caso C45 en donde las bandas se observan más marcadas, sugiriendo una mayor concentración para cada una de las proteínas presentes. Cabe remarcar la gran similitud entre los patrones del C40 y C53. En este mismo gel se incluyen los corrimientos de

CURVA PATRON DE ALBUMINA BOVINA METODO DE BRADFORD



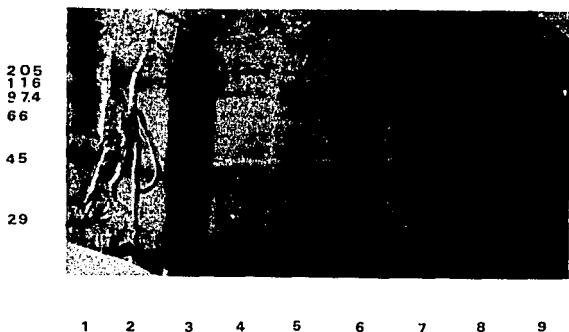
— Series 1

CADA PUNTO REPRESENTA EL PROMEDIO DE
TRES LECTURAS

GRAFICA # 1

FIGURA 11

PATRON ELECTROFORETICO EN GEL DE POLIACRILAMIDA
DE CEPAS DE *S. pyogenes* AISLADAS DE PACIENTES
CON FIEBRE REUMATICA Y SUS CONTACTOS FAMILIARES



<u>CARRIL</u>	<u>CEPA</u>	<u>CARRIL</u>	<u>CEPA</u>
1	MARC. PM	6	C 80a
2	C 40	7	C 53
3	C 45	8	C 53a
4	C 68	9	C 53b
5	C 80		

* CONCENTRACION DEL GEL. 15.5M

NOTA: NO SE OBSERVAN DIFERENCIAS IMPORTANTES EN LOS CASOS DE PACIENTES CON F.R. NI EN LA FAMILIA 80. ES NOTABLE LA DIFERENCIA ENTRE LOS CASOS DE LA FAMILIA 53, AUNQUE EL PATRON DE LOS 2 C.F DE ESTA FAMILIA ES IDENTICO.

los casos de C.F C80a, C53a y C53b, observandose una gran similitud entre los patrones de las cepas de los casos C80 y C80a. La cepa del caso C53 (carril 7) difiere del de sus C.F C53a y C53b (carril 8 y 9), en el primero es notable la ausencia de las bandas de Peso Molecular (P.M) entre 6 y 17 KDa y las localizadas entre 30 y 54 KDa cuando se compara con el patrón de sus C.F; sin embargo a pesar de estas diferencias existen 4 bandas que son comunes a estas 3 cepas del caso 53: las de P.M de 63, 55, 20 y 17 KDa; por otro lado, el patrón electroforético es idéntico para las cepas de estos 2 C.F (FIGURA 11).

En las figuras 12 y 13 y carriles 6, 8 y 9 de la figura 11 se muestran los patrones electroforéticos de cepas de *S. pyogenes* aisladas de los 10 C.F, observandose de manera general, una gran similitud entre todos los patrones, siendo esta más remarcada entre las cepas de una misma familia.

Cabe remarcar que en los patrones electroforéticos de todas las cepas de pacientes con F.R y C.F, aparece una "doble banda" de P.M aproximado de 45 y 48 KDa que en los casos C40 y C53 se ven muy ténues; además de una banda de P.M de 60 KDa y otra banda de P.M de 88 KDa.

FIGURA 12

PATRON ELECTROFORETICO EN GEL DE POLIACRILAMIDA
DE CEPAS DE *S. pyogenes* AISLADAS DE CONTACTOS FAMILIARES
DE PACIENTES CON FIEBRE REUMATICA



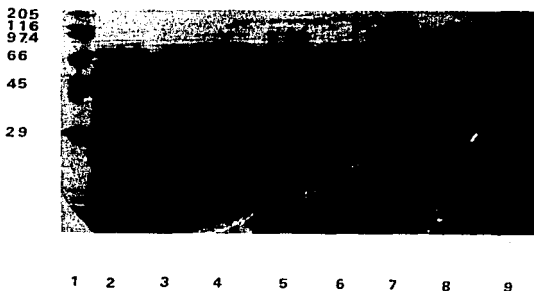
<u>CARRIL</u>	<u>CEPA</u>	<u>CARRIL</u>	<u>CEPA</u>
1	MARC. PM	6	C 54a
2	C 44b	7	C 54b
3	C 48a	8	C 54c
4	C 49c	9	C 81a
5	C 52a	10	MARC. PM

* CONCENTRACION DEL GEL. 15.5%

NOTA: NO SE OBSERVAN DIFERENCIAS IMPORTANTES EN TODOS
LOS PATRONES, RESALTANDO LA SIMILITUD DE ESTOS EN
LA FAMILIA 54.

FIGURA 13

PATRON ELECTROFORETICO EN GEL DE POLIACRILAMIDA
DE CEPAS DE *S. pyogenes* AISLADAS DE CONTACTOS FAMILIARES
DE PACIENTES CON FIEBRE REUMATICA



<u>CARRIL</u>	<u>CEPA</u>	<u>CARRIL</u>	<u>CEPA</u>
1	MARC. PM	6	C 61e
2	C 61a	7	C 69a
3	C 61b	8	C 69b
4	C 61c	9	C 69c
5	C 61d		

*CONCENTRACION DEL GEL. 15.5M

NOTA: SE OBSERVA UNA GRAN SIMILITUD EN TODOS LOS
PATRONES, RESALTANDO ESTA SIMILITUD ENTRE LOS
MIEMBROS DE UNA MISMA FAMILIA (FAMILIAS 61 Y 69)

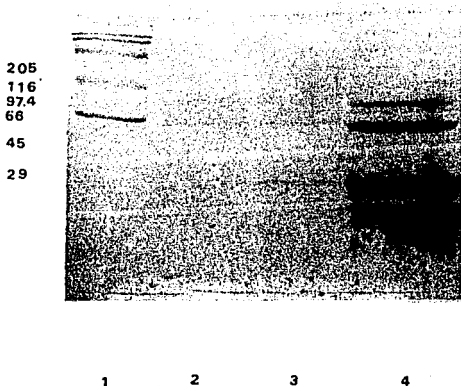
←ELECTROFORESIS DE EXTRACTOS CRUDOS DE PROTEINA M

DE S. pyogenes

Realizamos la extracción de Proteína M de acuerdo al método propuesto por Manjula y Fischetti (32), de las dos familias en las que se contaba tanto con cepa de paciente con F.R y cepa de su(s) respectivo(s) C.F, incluyendo al C40 que no posee C.F (TABLA 6). Al realizar la electroforesis en geles de poliacrilamida de estos extractos, observamos para la familia 80 (FIGURA 14), un patrón de bandas idéntico, resaltando la presencia de dos bandas de P.M aproximado de 17 y 29 KDa y una serie de bandas muy ténues por arriba de los 29 KDa; este patrón fue muy similar al observado para el caso C40 (FIGURA 14), en donde estas mismas dos bandas se ven muy intensas a comparación de la familia 80; para la familia 53 (FIGURA 15) el patrón de bandas es muy similar en los dos C.F, a excepción de una banda de P.M de 10 KDa observada en el caso C53b y que no se observa en el extracto del caso C53a, otras bandas de P.M de 17 y 29 KDa son observadas en los 2 C.F, además de una gran cantidad de bandas más ténues en el intervalo de los 29-66 KDa; para el caso del paciente, es posible apreciar una banda de P.M de 16 KDa y otra de 27 KDa, así como bandas más ténues por arriba de los 27 KDa.

FIGURA 14

PATRON ELECTROFORETICO EN GEL DE POLIACRILAMIDA
DE EXTRACTOS CRUDOS DE PROTEINA M DE *S. pyogenes*
AISLADOS DE PACIENTES CON FIEBRE REUMATICA
Y SUS CONTACTOS FAMILIARES



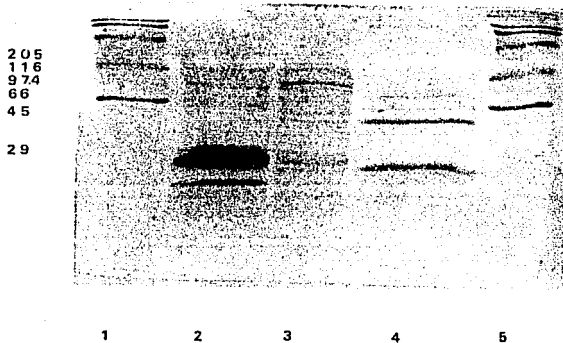
CARRIL	CEPA	VOL (μ l)
1	MARC. PM	5
2	C 80	25
3	C 80 _m	35
4	C 40	50

* CONCENTRACION DEL GEL. 15.5M

NOTA: SE OBSERVA UNA GRAN SIMILITUD EN EL PATRON DE LA FAMILIA 80 Y DEL C40, A EXCEPCION DE UNA MAYOR INTENSIDAD DE LAS BANDAS EN EL C40. DESTACAN LAS BANDAS DE P.M DE 17 Y 29 KDa EN LOS 2 CASOS.

FIGURA 15

PATRON ELECTROFORETICO EN GEL DE POLIACRILAMIDA
DE EXTRACTOS CRUDOS DE PROTEINA M DE *S. pyogenes*
AISLADOS DE PACIENTES CON FIEBRE REUMATICA
Y SUS CONTACTOS FAMILIARES



CARRIL	CEPA	VOL (μ l)
1	MARC. PM	5
2	C 53b	35
3	C 53a	15
4	C 53	85
5	MARC. PM	5

* CONCENTRACION DEL GEL. 45.5M

NOTA: EN LOS 2 C. F DESTACA LA PRESENCIA DE 2 BANDAS DE P. M DE 17 Y 20 KDa, PARA EL C53b DESTACA OTRA BANDA DE 10 KDa. PARA EL PACIENTE DESTACAN LAS BANDAS DE P. M DE 16 Y 27 KDa.

+ INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE EXTRACTOS DE CEPAS COMPLETAS DE *S. pyogenes* Y DE LOS EXTRACTOS DE PROTEINA M OBTENIDA.

Para la inmunodetección de las proteínas transferidas, se ensayaron 3 diluciones del suero problema correspondiente, no observándose diferencias significativas en la resolución de las bandas detectadas, por lo que la dilución elegida del suero fué la de 1:50 (FIGURA 16). Con respecto a las diluciones ensayadas del conjugado de Fosfatasa Alcalina, la que mejor resolución dió fué la de 1:3000 (FIGURA 17)

En la figura 18 se muestran la totalidad de los extractos de cepas completas de *S. pyogenes* que fueron inmunotransferidas y que corresponden a 4 cepas de pacientes y a 13 de C.F.

En la inmunoelectrotransferencia de los extractos de cepas completas de *S. pyogenes* logramos apreciar la diferencia entre los patrones de bandas de los casos correspondientes a pacientes con F.R y C.F (FIGURA 18), en donde es posible apreciar que en general hay un mayor número de bandas de bajo P.M (menores de 45 KDa) en los casos de C.F, comparado con los casos de pacientes que presentan la

FIGURA 16

INMUNOTRANSFERENCIA DE UNA CEPA DE *S. pyogenes*
(ESTANDARIZACION DE LA DILUCION DEL SUERO)

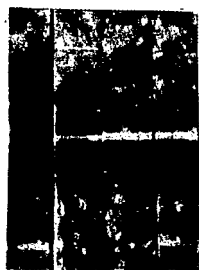


CARRIL	DILUCION
1	1:10
2	1:25
3	1:50

NOTA: SE OBSERVA MEJOR RESOLUCION CON LA DILUCION DEL
SUERO DE 1:50

FIGURA 17

INMUNOTRANSFERENCIA DE UNA CEPA DE *S. pyogenes*
(ESTANDARIZACION DE LA DILUCION DEL CONJUGADO DE
FOSFATASA ALCALINA)



1 2 3 4



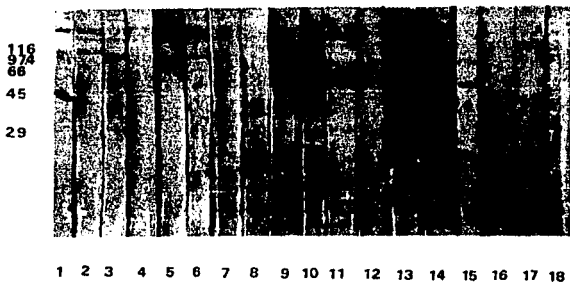
TESTIGOS
NEGATIVOS

1. - DILUCION DEL CONJUGADO 1:2000
2. - DILUCION DEL CONJUGADO 1:3000
3. - DILUCION DEL CONJUGADO 1:4000
4. - DILUCION DEL CONJUGADO 1:5000

NOTA: SE OBSERVA UNA MEJOR RESOLUCION A UNA DILUCION
DEL CONJUGADO DE 1:5000

FIGURA 18

INMUNOTRANSFERENCIA DE CEPAS DE *S. pyogenes*
AISLADAS DE PACIENTES CON FIEBRE REUMÁTICA
Y SUS CONTACTOS FAMILIARES



<u>CARRIL</u>	<u>CEPA</u>	<u>CARRIL</u>	<u>CEPA</u>
1	MARC. PM	10	C 61c
2	C 40	11	C 61d
3	C 45	12	C 61e
4	C 80	13	C 60a
5	C 80a	14	C 60b
6	C 53	15	C 44b
7	C 53a	16	C 54a
8	C 53b	17	C 54b
9	C 61b	18	C 54c

NOTA: SE MUESTRA EN ESTA FIGURA LA TOTALIDAD DE LOS
EXTRACTOS DE *S. pyogenes* INMUNOTRANSFERIDOS.
ES NOTABLE LA DIFERENCIA EN LOS CASOS DE
PACIENTES Y C. F., YA QUE EN LOS PRIMEROS SE
OBSERVA UN MENOR RECONOCIMIENTO DE BANDAS.

enfermedad, lo cuál indicaría que hay un mayor reconocimiento de antígenos de superficie de estreptococo por parte de los sueros de C.F, a excepción de los casos de la familia 54 carriles 16, 17 y 18 (FIGURA 18) en donde no hubo reconocimiento de ninguna banda. Se observa que los sueros de la mayoría de los C.F reconocen las dos bandas de P.M de 45 y 48 KDa, solo el caso C80a reconoce unicamente, a la de 48 KDa; mientras que los sueros de los pacientes solo reconocen una de ellas, a excepción del caso C45 que reconoce a las dos.

Con respecto las cepas inmunoelctrotransferidas de pacientes con F.R, es posible apreciar un patrón de bandas pobre en comparación de los C.F; en general en los 4 pacientes el patrón de bandas es similar, destacando el reconocimiento de una de las 2 bandas de P.M de 45 y 48 KDa presentes en los patrones electroforéticos a excepción del C45 que reconoce ambas bandas (FIGURA 19).

Por otro lado, una banda de P.M de 66 KDa que aparece en todos los patrones electroforéticos es reconocida por 3 de los 4 sueros de pacientes correspondientes, además es notable la similitud del patrón de reconocimiento entre los casos C40 y C53 (FIGURA 19).

Para las inmunoelctrotransferencias de los casos de C.F de pacientes con F.R, se observa una gran similitud entre los

FIGURA 19

INMUNOTRANSFERENCIA DE CEPAS DE *S. pyogenes*
AISLADAS DE PACIENTES CON FIEBRE REUMATICA

116
974
66
45
29



1 2 3 4

<u>CARRIL</u>	<u>CEPA</u>
1	C 40
2	C 45
3	C 80
4	C 53

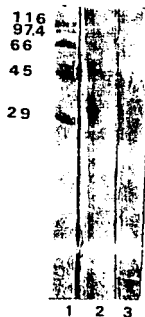
NOTA: SE MUESTRAN LAS IET DE SOLO LOS CASOS DE
PACIENTES CON F.R.
NO SE OBSERVAN DIFERENCIAS IMPORTANTES EN EL
PATRON DE BANDAS DE LOS 4 CASOS. ES NOTABLE EL
RECONOCIMIENTO DE LA BANDA DE P.M DE 40 KDa EN 3
DE LOS CASOS, ASI COMO UNA DE 66 KDa.

casos que pertenecen a la misma familia (FIGURAS 20, 21, 22 y 23). La banda de P.M de 66 KDa solo fué detectada en los casos C80a, C81c, C81d, C89a y C89b.

Con respecto a las dos familias en donde se tiene al paciente con F.R y a su(s) correspondiente(s) C.F; para la familia del caso 80 observamos que su respuesta de anticuerpos hacia antígenos de superficie del estreptococo por parte del paciente y su respectivo C.F es muy similar en el intervalo de 29 a 66 KDa (FIGURA 24), pero difiere en el intervalo localizado por arriba de los 66 KDa en donde los anticuerpos del suero del C.F reconocen antígenos en esta zona; antígenos no reconocidos por los anticuerpos del suero de paciente con F.R, destacando en el patrón una banda muy marcada, de P.M de 88 KDa y la presencia de bandas ténues de mayor P.M. La familia correspondiente al C53 muestra un patrón de bandas muy diferente entre el paciente y sus respectivos C.F (FIGURA 25); en primer lugar, los anticuerpos del suero de C.F reconocen aproximadamente 10 bandas de bajo P.M, comparado con el paciente, en donde la banda de menor P.M detectada fué de 45 KDa; en segundo lugar la banda de P.M de 66 KDa, está presente en el patrón del paciente y ausente en sus 2 C.F; otra diferencia es que el C.F reconoció la "doble banda" de P.M de 45 y 48 KDa observada en los patrones electroforéticos mientras que el

FIGURA 20

INMUNOTRANSFERENCIA DE CEPAS DE *S. pyogenes*
AISLADAS DE CONTACTOS DE LA FAMILIA 53



<u>CARRIL</u>	<u>CEPA</u>
1	MARC. PM
2	C 53a
3	C 53b

NOTA: AUNQUE NO SE OBSERVA MUY NITIDA LA FOTOGRAFIA.
LOS PATRONES DE BANDAS DE AMBOS CASOS ES MUY
SIMILAR.

FIGURA 21

INMUNOTRANSFERENCIA DE CEPAS DE *S. pyogenes*
AISLADAS DE CONTACTOS DE LA FAMILIA 69



1 2 3

CARRIL

CEPA

1

MARC. PM

2

C 09a

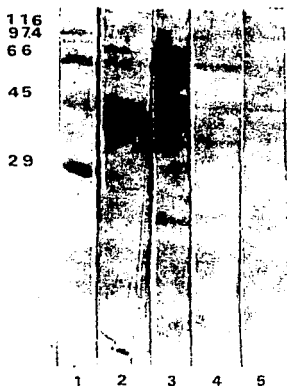
3

C 09b

NOTA: NOTESE LA GRAN SIMILITUD DEL PATRON DE BANDAS EN
LOS 2 CASOS, ADEMÁS DE LA CANTIDAD DE BANDAS
RECONOCIDAS.

FIGURA 22

INMUNOTRANSFERENCIA DE CEPAS DE *S. pyogenes*
AISLADAS DE CONTACTOS DE LA FAMILIA 61



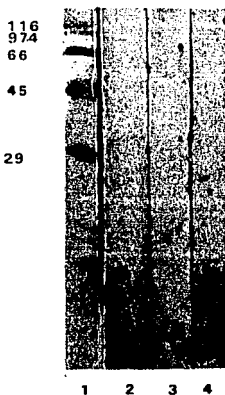
CARRIL	CEPA
1	MARC. PM
2	C 61b
3	C 61c
4	C 61d
5	C 61e

NOTA: NO SE OBSERVAN DIFERENCIAS IMPORTANTES ENTRE LOS
4 CASOS: ES NOTORIO EL RECONOCIMIENTO DE LA
DOBLE BANDA EN LOS 4 CASOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 23

INMUNOTRANSFERENCIA DE CEPAS DE *S. pyogenes*
AISLADAS DE CONTACTOS DE LA FAMILIA 54



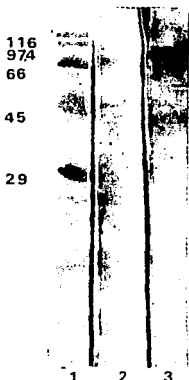
<u>CARRIL</u>	<u>CEPA</u>
1	MARC. PM
2	C 54a
3	C 54b
4	C 54c

NOTA: NO HUBO RECONOCIMIENTO DE NINGUNA BANDA EN LOS 3 CASOS.

FIGURA 24

INMUNOTRANSFERENCIA DE CEPAS DE *S. pyogenes*
AISLADAS DE UN PACIENTE CON FIEBRE REUMÁTICA
Y SU CORRESPONDIENTE CONTACTO FAMILIAR

(FAMILIA 80)



CARRIL	CEPA
1	MARC. PM
2	C 80
3	C 80a

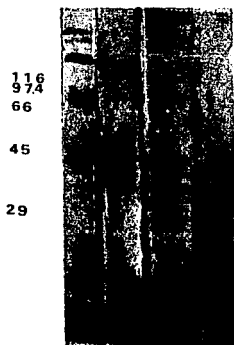
NOTA: EL RECONOCIMIENTO DE BANDAS EN EL INTERVALO DE LOS 29-66 KDa ES MUY SIMILAR ENTRE EL PACIENTE Y EL C. F. PERO HAY MAYOR RECONOCIMIENTO DE BANDAS POR ARRIBA DE LOS 66 KDa POR EL SUERO DEL C. F.

-6-
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 25

INMUNOTRANSFERENCIA DE CEPAS DE *S. pyogenes*
AISLADAS DE UN PACIENTE CON FIEBRE REUMÁTICA
Y SUS CORRESPONDIENTES CONTACTOS FAMILIARES

(FAMILIA 53)



1 2 3 4

<u>CARRIL</u>	<u>CEPA</u>
1	MARC. PM
2	C 53
3	C 53a
4	C 53b

NOTA: SE OBSERVA UN MAYOR RECONOCIMIENTO DE BANDAS DE
BAJO P. M EN LOS C. F COMPARADO CON EL PACIENTE.
ES NOTABLE LA PRESENCIA DE LA BANDA DE 66 KDa EN
EL PACIENTE Y AUSENTE EN LOS 2 C. F

paciente reconoció solo la de P.M de 45 KDa.

Con respecto a los 6 extractos crudos de Proteína M es posible apreciar una gran heterogenicidad en el patrón de bandas reconocidas por los sueros correspondientes de todos los casos. Para el caso C53 el paciente reconoce una serie de bandas de P.M aproximado entre 31 y 45 KDa; el caso C53a reconoce una serie de bandas entre 29 y 38 KDa y el caso C53b entre 25 y 29 KDa. Es notable que estas bandas se observan muy ténues en sus respectivos patrones electroforéticos y también para cada caso las bandas más marcadas no son reconocidas por los sueros problema.

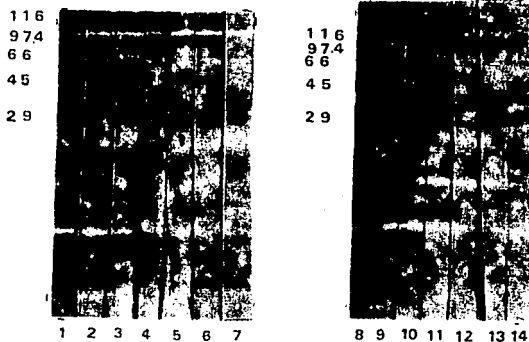
Para el caso C80 se observa un comportamiento similar, ya que son reconocidas bandas que se observan muy ténues en el patrón electroforético correspondiente: para el caso C80 aproximadamente entre 25 y 37 KDa, para el caso C80a entre 20 y 35 y para el caso C40 dos bandas de P.M aproximado de 38 y 59 KDa. Para el caso C40 ninguna de las 3 bandas principales observadas en su patrón electroforético, son reconocidas por su suero correspondiente (FIGURA 26).

En la tabla 7 se muestra un resumen de las bandas observadas en los patrones electroforéticos de extractos de cepas completas de *S. pyogenes* y las detectadas en las inmunoelectrotransferencias.

FIGURA 26

INMUNOTRANSFERENCIA DE EXTRACTOS DE PROTEINA M
DE CEPAS DE *S. pyogenes*
AISLADAS DE PACIENTES CON FIEBRE REUMATICA
Y SUS CONTACTOS FAMILIARES

(FAMILIAS 53 Y 80)



CARRIL	CEPA	CARRIL	CEPA
1	MARC. PM	8	MARC. PM
2	C 53	9	C 80
3	C 53a	10	C 80a
4	C 53b	11	C 40
5	TN	12	TN
6	TN	13	TN
7	TN	14	TN

TN. TESTIGOS NEGATIVOS

Tabla 9: Patrones de bandas de electroforesis u de inmunoelectrotransferencias

Muestra	Bandas observadas en electroforesis		Bandas detectadas en Inmunoelectrotransferencia	
	Cepas de Pacientes	Cepas de Contactos	Cepas de Pacientes	Cepas de Contactos
Extractos de Cepas completas	C40: 3 bandas de P.M. 60, 55 y 75 KDa		C40: 2 bandas de P.M. 66 y 45 KDa	
	C45: Aproximadamente 30 bandas de P.M. entre 5 y 116 KDa, destacando la banda de P.M. 45 y 48 KDa		C45: "Doble banda" de 45 KDa y banda de 29 KDa	
	C68: 8 bandas de P.M. 5, 20, 30, 33, 35, 42, 46 y 60 KDa			
	C80: 11 bandas de P.M. 5, 20, 17, 30, 33, 35, 42, 45, 46, 48 y 60 KDa. Además bandas muy débiles en el rango de 66-97 KDa	C80a: Mismas bandas que en el C80, además de una de 43 KDa	C80: 2 bandas de P.M. 66 y 45 KDa	C80a: 4 bandas de P.M. 116, 70, 66 y 45 KDa

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Muestra	Bandas observadas en electroforesis		Bandas detectadas en Inmunolectrotransferencia	
	Cepas de Pacientes	Cepas de Contactos fam	Cepas de Pacientes	Cepas de Contactos fam
	C53: 6 bandas de P.H. 2, 3, 17, 20, 50 y 63 KDa	C53a: Aproximadamente 35 bandas en un rango de P.H. de 5 y 116 KDa, destacando en concentración las bandas de P.H. 70, 65, 45, 17 y 7 KDa C53b: Mismo patrón que para C53a Familia C61: Aproximadamente 30 bandas en el rango de P.H. de 2 y 116 KDa, destacando en concentración una doble banda de P.H. 45 y 48 KDa	C53: 4 bandas de P.H. 116, 100, 45, y 66 KDa	C53a: Patrón muy difuso: "Doble banda" de P.H. 45 KDa y 3 bandas de P.H. 30, 33 y 17 KDa C53b: Idéntico al C53a Familia C61: 3 bandas de P.H. 95, 65 y 60 KDa, además de la doble banda de 45 KDa 7 bandas muy tenues en el rango de P.H. 43 y 10 KDa

TESIS COM
 FALLA DE ORIGEN

Huestra	Bandas observadas en electroforesis		Bandas detectadas en Inmunolectrotransferencia	
	Cepas de Pacientes	Cepas de Contactos lam	Cepas de Pacientes	Cepas de Contactos lam
		<p>Familia C69: Igual que para la familia C61</p> <p>Familia: C53: Aproximadamente 30 bandas en el rango de P.M. de 1 a 116 KDa, destacando en concentración las bandas de P.M.: 29, 32, 40, 65 u la doble banda de 45 u 48 KDa</p> <p>C44b: 7 bandas de P.M. 29, 30, 34, 35, 40, 45 u 100 KDa. Además de 6 bandas en el rango de 15-66 KDa</p>		<p>Familia C69: 15 bandas débiles en el rango de P.M. de 53-100 KDa u otras 15 en el rango de P.M. 43 u 10 KDa, además de la doble banda de 45 KDa.</p> <p>Familia C54: No hubo reconocimiento.</p>

Muestra	Bandas observadas en electroforesis		Bandas detectadas en Inmuno-electrotransferencia	
	Cepas de Pacientes	Cepas de Contactos fam	Cepas de Pacientes	Cepas de Contactos fam
Extractos de PT-M	C53: 2 bandas de P.M. 16 KDa u otra de 27 KDa. Además de aproximadamente 5 bandas de P.M. 29-45 KDa	C53a: 3 bandas de P.M. 17 KDa, 29 y 40 KDa. Además de bandas muy tenues en el rango de 29-40 KDa u en el de 40 a 66 KDa C53b: Igual que para C53a + una banda de ~10 KDa	C53: 4 bandas en el rango de P.M. de 33-45 KDa	C53a: 6 bandas en el rango de 29-40 KDa C53b: 1 banda de P.M. de 32 KDa u 3 bandas muy tenues en el rango de 25-29 KDa

Muestra	Bandas observadas en electroforesis		Bandas detectadas en Inmunolectrotransferencia	
	Cepas de Pacientes	Cepas de Contactos fam	Cepas de Pacientes	Cepas de Contactos fam
	<p>C80: 2 bandas de P.H. 117 KDa y de 29 KDa u una serie de bandas en el rango de P.H. de 29-66 KDa</p> <p>C40: 3 bandas de P.H. 17, 29 y 32 KDa</p>	<p>C80a: Patrón idéntico al del C80</p>	<p>C80: 2 bandas 1 de P.H. 32 y otra de 40 KDa</p> <p>C40: 7 bandas de P.H. 30, 35, 40, 43, 45, 60 u 97 KDa</p>	<p>C80a: 4 bandas de P.H. 27, 29, 32 u 33 KDa además de 3 muy débiles de 118, 97 u 80 KDa</p>

DISCUSION

Estudios epidemiológicos revelan que debe existir alguna característica importante en la relación huésped parásito, que de alguna manera predisponen a ciertos individuos a desarrollar una respuesta inmune aberrante durante la F.R. El concepto de una susceptibilidad genética a la enfermedad por parte del huésped se basa en las siguientes observaciones: a) El grado de fluctuación de las infecciones estreptocócicas no tiene efecto sobre la incidencia de esta enfermedad, la cuál permanece constante; b) Los individuos susceptibles a la F.R. presentan una respuesta celular y humoral alterada hacia ciertos antígenos del estreptococo que comparten determinantes antigénicos con tejido de mamíferos; c) Hay una incidencia elevada del antígeno HLA-DR 4 en pacientes de raza blanca con F.R; d) La presencia del aloantígeno (883) en células B de un alto porcentaje de pacientes reumáticos (36, 37).

El propósito del trabajo es comparar mediante inmunolectrotransferencia la respuesta humoral de pacientes con F.R y C.F, primero hacia antígenos de cepas completas de *S. pyogenes*, tratadas con SDS - Mercapto - Etanol (Ver Materiales y Metodos) y posteriormente hacia extractos crudos

de Pt-M de algunas de estas cepas (TABLA 6).

Primeramente se obtuvieron los patrones electroforéticos del total de las cepas (TABLA 4). Solo el 25% (6/24) de nuestras cepas fueron tipificables por M con los antisueros probados; es importante señalar que constantemente se reporta la aparición de nuevos serotipos para los cuáles no se cuenta con el antisuero correspondiente. Los serotipos M encontrados en nuestro estudio fueron M1, M2, M8, M12, M14 y M55. En los patrones electroforéticos obtenidos, en 4 de 5 pacientes, las bandas se observan muy ténues y solo en 2 C.F de 19 se observa esta situación; Stollerman en una revisión realizada en 1991 establece que las cepas de serotipos reumatogénicos poseen una cápsula muy prominente, dando lugar a la formación de colonias mucoides en cultivos de Agar Sangre (37). De las 5 cepas de pacientes con F.R, solo 2 pertenecen a un serotipo M conocido, y de estas 2, la cepa del caso C45, pertenece al serotipo M2, un serotipo que aún no ha sido asociado dentro del grupo reumatogénico ó el nefritogénico (25), la otra cepa de paciente con F.R es el caso C40 que corresponde al serotipo M8, para el cuál existe muy poca información en la literatura, y por lo tanto no sabemos si pertenece al grupo nefritogénico ó reumatogénico; las 3 cepas restantes de pacientes con F.R

no fueron tipificadas por M lo cual no descarta la posibilidad de que pudiera tratarse de serotipos reumatogénicos. Para C.F la mayoría de las cepas muestran un patrón de bandas muy intenso, a excepción de los casos C80a (FIGURA 11, carril 6) C 44b (FIGURA 12, carril 2), cuyo patrón es muy ténue; ambos casos fueron no tipificables por M. Una posible explicación para la observación de estos patrones podría ser el hecho de que para algunos casos durante el proceso de preparación de extractos de cepas completas hubo pérdida de células durante los lavados del paquete celular ya que estas presentaban características muy mucoides que le impedían formar un paquete compacto después de centrifugar, lo cual podría originar una disminución en la cantidad de muestra sometida al tratamiento con SDS, y como consecuencia originar patrones electroforéticos más ténues; esta explicación concuerda con lo establecido por Stollerman (37). Otra observación notable es la presencia de un "doble banda" de un P.M aproximado de 45 y 48 KDa que está presente en todos los patrones electroforéticos de cepas de pacientes y de C.F (FIGURAS 11, 12 y 130) por lo que suponemos que se trata de un antígeno común a todas ellas.

Existen pocas referencias en donde se reporte el P.M,

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

por movilidad electroforética, de antígenos estructurales del estreptococo, lo cual nos hace difícil asociar las bandas de los patrones electroforéticos obtenidos a algún antígeno en particular de este microorganismo; también existe poca información en la bibliografía acerca de corrimientos de cepas completas de *S. pyogenes* en geles de poli(acrilamida). Cunningham y col. (1986), trabajaron con un extracto de cepa completa de estreptococo grupo A, serotipo M5, obtenido por tratamiento de la cepa con SDS al 5%; los antígenos del estreptococo presentes en el sobrenadante fueron separados por electroforésis en geles de poli(acrilamida) y enfrentados por inmunoelectrotransferencia contra anticuerpos monoclonales estreptocócicos de reacción cruzada con corazón. Estos autores observaron que el P.M de 3 bandas prominentes concordaban con el P.M de la proteína M5 (61 KDa); esta observación se confirmó al realizar electroforésis e inmunoelectrotransferencia de extractos puros del Pep M5, utilizando anticuerpos contra esta molécula (13).

En la literatura se ha reportado para el Pep M1, un triplete de P.M de 23.5, 25 y 28 KDa (27) y para el Pep M12 un P.M de 38 KDa (28); para el resto de los serotipos de este estudio no hay datos a este respecto; posiblemente debido a que no son serotipos muy frecuentemente

aislados de casos ó epidemias de F.R ó GNA en México u otros países. Al interpolar los pesos moleculares del Pep M1 y Pep M12 en el patrón electroforético correspondiente (FIGURA 12), es posible apreciar para la cepa del caso C48a (M1) un conjunto de bandas de Pesos Moleculares aproximados a los reportados para la proteína M de este serotipo; para la cepa del caso C49c (M12) es posible apreciar también una banda de P.M aproximado a 38 KDa; sin embargo, debido a la gran similitud de los patrones electroforéticos de todas las cepas, no podemos asegurar que estas bandas correspondan a la Proteína M, ya que es posible identificarlas en todos ellos.

La presentación de estos datos en fotografía no revela toda la complejidad que usualmente se observa en un exámen visual directo de un gel teñido. Por otro lado se acepta con tales sistemas que la comparación de patrones electroforéticos banda por banda es en ocasiones un tanto problemático; un análisis satisfactorio se puede lograr mediante la utilización de isotopos, fraccionamiento del gel, pero implica el disponer de una mayor infraestructura de la que no disponemos (31).

Desde nace tiempo se piensa que existen mecanismos inmunológicos involucrados en la patogenia de F.R ya que

existe una respuesta inmune aumentada hacia antígenos del estreptococo en pacientes con esta enfermedad, en comparación con la población que presenta infección faríngea por este microorganismo, pero que no desarrolla F.R (6); otro hecho notable es que existen estudios que demuestran que tanto los individuos infectados con *S. pyogenes* como los enfermos de F.R pueden tener una respuesta exagerada a miosina en comparación con individuos sanos. En las infecciones no complicadas la respuesta exagerada se observa solo en el 50% de los casos (38).

Existen varios estudios en donde se reporta la existencia de reacciones cruzadas entre los antígenos del estreptococo y tejido del hospedero (41, 19, 24, 14, 13, 17 y 2). Al realizar las inmunoelctrotransferencias de los extractos de cepas completas de *S. pyogenes*, se lograron apreciar diferencias entre los patrones de bandas de los casos correspondientes a pacientes con F.R y C.F (FIGURA 18), en donde es posible apreciar que en general hay reconocimiento de un mayor número de bandas de bajo P.M (menores de 45 KDa) por parte de los sueros de C.F, comparado con los de pacientes que presentan la enfermedad.

Algunos estudios han demostrado que los diferentes serotipos de proteínas M del estreptococo, estimulan

subpoblaciones de células T, fenotípica y funcionalmente distintas. En el año de 1989 Kotb y col. demostraron que el Pep M5 estimulaba la proliferación de células CD4 y 4B4 (Cooperadora/Inductora) y de células CD8, con actividad citotóxica; sin embargo se encontró que el Pep M24 estimulaba solo la proliferación de Células CD8 sin actividad citotóxica. Parece ser que el hecho de que el Pep M24 no genere actividad citotóxica, está relacionado a su capacidad para generar células con actividad supresora (26). Esto podría ser otra explicación para lo observado en los patrones de inmunoelectrotransferencia de cepas de pacientes con F.R y C.F, pudiendose sugerir que las cepas aisladas de pacientes pudieran pertenecer a un serotipo que presentara esta capacidad de inducir supresión. De nuestras cepas aisladas de pacientes una es serotipo M2 y otra M6, serotipos para los cuáles no hay estudios reportados a este respecto, además de que son serotipos poco frecuentemente aislados de brotes de F.R. Si esto resultara cierto será un hecho único, ya que la F.R, se ha asociado con una respuesta humoral exacerbada en F.R. (6).

En la familia 54 (FIGURA 18, carriles 16, 17 y 18), en donde no hubo reconocimiento de ninguna banda; esto probablemente sea debido a: 1) Que estos contactos no desarrollaron anticuerpos contra ninguno de los antígenos del

estreptococo, lo cuál es poco probable, 2) Que los anticuerpos contra antígenos del estreptococo están presentes pero en cantidades no demostrables por este método, 3) A que los antígenos de estas cepas resultaron alterados por el tratamiento con SDS-Mercapto-Etanol, impidiendo la unión Ag-Ac durante la inmunodetección; en 1988 Wedege y col. establecen que el calentamiento con SDS de algunos antígenos, puede originar la desnaturalización de determinantes antigénicos, alterando la unión Ag-Ac en inmunotransferencia (40), 4) A que no se hubiera realizado la transferencia de las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa; esto puede descartarse, debido a que en cada ensayo de inmunoelectrotransferencia realizado, la transferencia de las proteínas se comprobó por medio de tinción con Rojo de Ponceau (Ver Materiales y Metodos). Para la familia 54, toda la técnica se repitió 3 veces para descartar un posible error en algún paso de la técnica, y en las 3 ocasiones no hubo reconocimiento de ninguna banda. Con respecto a las dos familias en donde se tiene al paciente con F.R y a su (s) correspondiente (s) C.F (Familia 80 y Familia 53), se observó que la respuesta de anticuerpos hacia componentes del estreptococo por parte del paciente y su respectivo C.F para la familia 80 fué

muy similar en el intervalo de 29 a 66 KDa (FIGURA 18, carriles 4 y 5), pero difiere en el intervalo localizado por arriba de los 66 KDa, en donde los anticuerpos del suero del C.F reconocen antígenos en esta zona que no son reconocidos por los anticuerpos del paciente con F.R. Destaca en el patrón una banda de P.M de 88 KDa, junto con otras bandas ténues de mayor P.M. La familia del caso C53, se sujeta al patrón general, es decir, los C.F reconocen un mayor número de bandas que el paciente. Otra diferencia importante es que los sueros de pacientes con F.R, excepto el C45, reconocen solo uno de los componentes de la "doble banda" observada en los patrones electroforéticos, con P.M de 45 KDa; mientras que los sueros de C.F reconocen la doble banda a excepción del C80a, que reconoce solo una de ellas (FIGURA 18). Esta "doble banda" posiblemente pertenece a algún componente de la célula estreptocócica que por tratamiento con SDS da origen a dos componentes de P.M muy cercano; Laemmli en 1970, estableció que muchas proteínas son solubles y monoméricas en SDS ya que las rompe en cadenas polipeptídicas individuales (20). Es probable que esta y otras bandas no reconocidas por pacientes podrían estar interviniendo en la estimulación de anticuerpos involucrados en protección, ya que se ha establecido que los enfermos de

F.R presentan una respuesta inmune alterada como podría ser una respuesta protectora pobre hacia la proteína M del estreptococo del grupo A (38).

Se ha reportado que el P.M de la proteína M extraída con pepsina varía según el serotipo del que se trate (35); sin embargo no hay reportes acerca de como podría aparecer la proteína M en una cepa tratada con SDS y Mercapto-etanol. Se ha establecido que la proteína M es una molécula fibrilar formada por dos cadenas polipeptídicas (35), esto coincide con la observación de la "doble banda" presente en todos los patrones electroforéticos de las cepas estudiadas; aunque no tenemos manera de demostrar que esta "doble banda" es realmente proteína M.

Tratando de aportar un mayor número de datos a este respecto se realizó la extracción de Proteína M, de acuerdo al método propuesto por Manjula y Fischetti (32), de las dos familias en las que se contaba tanto con cepa de paciente con F.R y cepa de su (s) respectivo (s) C.F, incluyendo al caso C40.

Cunningham y Beachey en 1977 lograron obtener proteína M mediante el tratamiento suave de los estreptococos con pepsina diluida a pH de 5.8; la proteína M obtenida por este método, denominada Pep M, posee el extremo amino terminal

de la molécula el cuál juega un papel muy importante en la actividad biológica de esta proteína, ya que los anticuerpos protectores, base de la inmunidad en el hombre, son dirigidos hacia esta región de la molécula. Se ha sugerido que el Pep M representa aproximadamente la mitad amino-terminal de la molécula M nativa (36, 35).

Manjula y Fischetti en 1980 establecen que las proteínas M tienen una región que es susceptible a la acción de la pepsina y que posiblemente las regiones de esta molécula involucradas en la actividad inmunológica, tienen un dominio compacto que es más resistente a la digestión con pepsina que otras regiones de la molécula (32).

Al realizar electroforesis en geles de poliacrilamida de nuestros extractos crudos de Proteína M, se observo en la familia 80 y caso C40, la presencia de dos bandas principales de P.M de aproximadamente 20 y 30 KDa, además de una serie de bandas menores muy ténues; para la familia 53 se aprecia una banda de aproximadamente 20 KDa y otra de 30 KDa para los 2 C.F, además de una banda de 10 KDa en uno de los C.F y para el paciente con F.R se observa una banda de aproximadamente 16 KDa y otra de P.M aproximado de 27 KDa, apreciandose además una gran cantidad de bandas menores muy ténues en toda la familia. Esto concuerda con lo encontrado por Beachey en 1977 (5) y por Manjula y Fischetti en 1980 (32).

Se ha reportado que el P.M de los Pep M, fluctua entre los 40-80 KDa, dependiendo del serotipo (35). Esto nos hace suponer de manera general que posiblemente las bandas de P.M de 10 y 17 KDa son fragmentos de proteína M degradada, debido ya sea a un período largo de digestión con la pepsina ó a la potencia de la pepsina empleada, ya que en este estudio se empleó la misma cantidad de pepsina utilizada por Manjula y Fischetti (32), pero la potencia de la pepsina empleada en ambos casos fué diferente. Nosotros realizamos la digestión a diferentes tiempos (resultados no mostrados), y no observamos diferencias importantes en el patrón de bandas de un tiempo a otro, por lo que decidimos emplear el tiempo de 45 minutos recomendado por Fischetti. Esto además nos podría indicar que el antígeno (presumiblemente proteína M) que se está degradando tenga un P.M aproximado de 30 KDa y su degradación de origen a las bandas de menor P.M (10 y 17 KDa), si esto resultara cierto, se podría suponer que los serotipos de proteína M de las dos familias y el caso C40, sean los mismos, debido a la similitud del P.M de las bandas obtenidas. Fischetti y col. en 1985, al estudiar a la proteína M de varios serotipos por IET usando anticuerpos monoclonales anti M6 y anticuerpos monoespecificos hacia N-acetilglucosamina después de la solubilización de la pared celular del estreptococo con enzimas muralíticas, observan un

patrón de bandas muy heterogéneo, observándose bandas muy ténues que no reaccionaron con el anticuerpo monoclonal anti M6, estableciendo que estas bandas pueden representar productos de degradación de la proteína M, carentes de epitopes ó tratarse de antígenos de superficie como proteínas T y R (15). En 1987 Jones y Fischetti trabajaron con proteína semejante a M de estreptococo grupo G y proteína M del grupo A serotipo M6, realizando IET de extractos de Proteína M, ellos observan un patrón de bandas muy similar en ambos grupos, incluyendo bandas difusas de elevado P.M, estableciendo que estas bandas pueden representar proteína M unida a fragmentos de la pared celular, conteniendo carbohidrato grupo específico (21).

Si asumimos que los extractos crudos de Proteína M estan compuestos principalmente del extremo amino de la Proteína M y fracciones de mayor y menor P.M de este, podemos asegurar que sí hay diferencias en el reconocimiento de estos fragmentos entre pacientes y C.F. Se observa que en las dos familias los contactos reconocen fragmentos de la molécula de menor P.M de aproximadamente 25-29 KDa. Sin embargo no podemos asegurar si las bandas reconocidas pertenecen a el Pep M ó a fracciones de este ya que no disponemos de datos acerca del P.M de los Pep M de los serotipos estudiados,

además de que algunas cepas no fueron tipificables por M con los antisueros probados.

Se ha reportado que dentro del extremo amino terminal de la proteína M, se encuentran los epitopos protectores; sin embargo existen también algunos no relacionados con protección e incluso, para algunos serotipos, otros más relacionados con reacciones cruzadas con tejidos del huésped. Estos datos nos parecen sugerir nuevamente, que las fracciones o bandas no reconocidas por los pacientes pudieran estar relacionadas con protección. Sin embargo, el poder determinar esto requeriría de pruebas más directas tales como inmunización pasiva ó pruebas de poder bactericida.

Cabe mencionar que existe una baja frecuencia de aislamiento de *S. pyogenes* en pacientes con F.R, esto aunado a que no existe total seguridad de que la cepa aislada en el momento del ataque reumático sea la misma que provocó la enfermedad; ya que existe un período de latencia de 3 semanas aproximadamente, entre la infección faríngea y el desarrollo de F.R. Por lo que un estudio de este tipo no siempre resulta fácil, sobre todo para la obtención de un buen número de cepas y sueros que permitan el análisis de un mayor número de datos. A este inconveniente es necesario añadir que no en

todos los casos se logra la cooperación del núcleo familiar que rodea al paciente.

Sin embargo podemos establecer que sí hay diferencias en la respuesta humoral hacia *S. pyogenes* entre pacientes con F.R y sus C.F, aunque no sabemos con exactitud hacia que componente o fragmento de la proteína M de este microorganismo radica esa diferencia; por lo que este trabajo puede abrir caminos hacia nuevas investigaciones en las cuáles se trate de determinar de una manera más específica las diferencias en la respuesta humoral hacia antígenos de *S. pyogenes* entre pacientes con F.R y C.F, por ejemplo utilizando extractos purificados de proteína M e incluso hacia fracciones de este mismo antígeno.

CONCLUSIONES

- 1.- No hay diferencias importantes en los patrones electroforéticos de cepas completas de *S. pyogenes* aislados de pacientes con F.R. y de C.F..
- 2.- Los sueros de C.F reconocen un mayor número de bandas en comparación con los de pacientes. Estas bandas presentan un P.M aproximado de 45-10 KDa. Esto parece sugerir un estado de supresión en la respuesta de anticuerpos en los pacientes con F.R.
- 3.- Los pacientes con F.R no reconocen a los fragmentos de bajo P.M de los extractos crudos de Proteína M particularmente a aquellos situados entre los P.M de 27-20 KDa. Esto parece sugerir que estos fragmentos de la Proteína M pudieran contener los epitopos responsables de la posible inducción de la formación de anticuerpos protectores.

APENDICE

REGULADOR DE MUESTRA 2X:

- Tris 0.5M, pH 6.8 2.5 ml
- SDS 10% 4.0 ml
- Agua bidestilada 0.5 ml
- Glicerol 2.0 ml

Se divide en alícuotas de 1 ml y se congela.

Al momento de usarse se agregan 100 μ l de mercapto-etanol por cada 1 ml de regulador y unos cristales de azul de bromofenol.

SOLUCION DE MONOMEROS:

- Acrilamida 30 g
- Bisacrilamida 0.8 g
- Agua bidestilada hasta 100 ml

Se filtra en papel Whatman 1 y se guarda en la oscuridad a 4°C.

REGULADOR DEL GEL DE SEPARACION (TRIS - HCL 15M PH 8.8)

- Trizma Base 18.15 g
- Agua bidestilada 90 ml
- Se ajusta el pH con HCl 6N
- Se sifona a 100 ml

Se filtra en papel Whatman 1 y se guarda a 4°C.

REGULADOR DEL GEL CONCENTRADOR (TRIS - HCL 0.5M
PH 6.8)

- Trizma Base 3.0 g
- Agua bidestilada 40 ml

Se ajusta el pH con HCl 6N

- Aforar a 50 ml

Se filtra en papel Whatman 1 y se guarda a 4°C

REGULADOR DE CORRIMIENTO:

- Trizma Base 3.0 g
- Glicina 14.4 g
- SDS al 10% 10 ml
- Agua bidestilada hasta 1 l

DECOLORANTE I:

- Metanol Absoluto 500 ml
- Acido Acético Glacial 100 ml
- Agua bidestilada 400 ml

DECOLORANTE II:

- Acido Acético al 7%

REGULADOR DE TRANSFERENCIA:

- Trizma Base 9.07 g
- Glicina 43.2 g
- Metanol 600 ml
- Agua bidestilada 2400 ml

PBS 10X.PH 7.4

- NaCl	80 g
- KH_2PO_4	2 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	29 g
- KCl	2 g
- Agua bidestilada	900 ml
Ajustar a pH 7.4	
- Agua bidestilada hasta	1 l

REGULADOR DE BLOQUEO:

- Leche en polvo	5 g
- PBS 10X	100 ml

REGULADOR DE LAVADO PBS-TWEEN 20 - 0.1%

- PBS 10X	100 ml
- Tween 20	1 ml
- Agua bidestilada	900 ml

CONJUGADO DE FOSFATASA ALCALINA (DILUCION 13000):

- Conjugado de Fosfatasa Alcalina (IgG de cabra anti IgG humana).	1 μ l
- Regulador de Bloqueo	2.999 ml

SUSTRATO DE LA FOSFATASA ALCALINA:

- Cloruro de Magnesio 1M 40 μ l
- Tris 0.05M pH 10 9.5 ml
- Stock de NTB 0.5 ml
- Stock de BCI 200 μ l

NTB 1 mg / ml (0.1% en Agua)

BCI 5 mg / ml en Dimetil Formamida

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Amezcua, F.J., Aranda, O.S.. 1970. Cardiólogos del programa de prevención de F.R del IMSS. Fiebre Reumática Hospital de enfermedades del tórax. CMN México 7, D.F.
- 2.- Baird, R.W., et al.. 1991. Epitopes of group A streptococcal M protein shared with antigens of articular cartilage and sinovium. J. Immunol. 146: 3132-3138
- 3.- Beachey, E.H., et al.. 1986. Opsonic antibodies evoked by hibrid peptide copies of type 5 and 24 streptococcal M proteins synthesized in tandem. J. Exp. Med. 163: 1451-1472
- 4.- Beachey, E.H. Y Sayer, J.M.. 1986. Protective and no protective epitopes of chemically synthesized peptides of the NH terminal region of type 6 streptococcal M protein. J. Immunol. 136: 2287-2299
- 5.- Beachey, E.H., et al.. 1977. Purification and properties of M protein extracted from group A Streptococci with pepsin: covalent structure of the amino terminal region of type 24 M antigen. J. Exp. Med. 145: 1469-1483
- 6.- Bernstein, M.R.. 1980. Humoral autoimmunity in systemic rheumatic disease. A review. J.R. coll. Physicirs Lond. 24: 18-25
- 7.- Bradford, M.M.. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- 8.- Bronze, M.S., Beachey, E.H. Y Dale, J.B.. 1988. Protective and heart cross reactive epitopes located within the NH₂ terminus of type 19 streptococcal M protein. J. Exp. Med. 167: 1849-1863
- 9.- Cadenas, M.G.. 1990. Rheumatic fever: Clinical and therapeutic aspects. An Esp Pediatr. 32: 225-227
- 10.- Ceja, S.H.. 1988. Características bacteriológicas e inmuno génicas de cepas de *S. pyogenes* aisladas de

pacientes con Fiebre Reumática y sus Contactos Familiares. Especialidad en laboratorio de infectología en salud pública. México, D.F

- 11.- Cleary, P.P., et al.. 1992. Clonal basis for resurgence of serious streptococcus pyogenes disease in the 1980's. *Lancet*. 339: 518-521
- 12.- Cunningham, M.W. Y Beachey, E.H.. 1974. Peptic Digestion of streptococcal M protein. I Effect of digestion of suboptimal pH upon the biological and immunochemical properties of purified M protein extracts. *Infect. and Immunity*. 9: 244-248
- 13.- Cunningham, M.W. Y Swerlick, R.A.. 1986. Polyspecificity of anti estreptococcal murine monoclonal antibodies and their implications in autoimmunity. *J. Exp. Med.* 164: 998-1012
- 14.- Dale, J.B Y Beachey, E.H.. 1985. Epitopes of streptococcal M proteins shared with cardiac myosin. *J. Exp. Med.* 162: 583-591
- 15.- Fischetti, V.A., Jones, K.F. Y Scott, J.R.. 1985. Size variation of the M protein in group A Streptococci. *J. Exp. Med.* 161: 1384-1401
- 16.- Fischetti, V.A. Y Windels, M.. 1988. Mapping the immunodeterminants of the complete streptococcal M5 protein molecule. Identification of an immunodominant region. *J. Immunol.* 141: 3592-3604
- 17.- Giono, S.C.. 1987. Aspectos inmunológicos de la Fiebre Reumática. *Cardi* 5: 138-141
- 18.- Giono, S.C., Barraza, A.S. Y Castro, H.A.. 1974. El estreptococo y la Fiebre Reumática. *Rev. Lat-americ Microbiol.* 16: 111-122
- 19.- Goldstein, I., Halpen, B. Y Robert, L. 1967. Immunological Relationship between Streptococcus A polisaccharide and the structural glycoproteins of heart valve. *Nature* 213: 44-47
- 20.- Homer, C., Shulman, T.S.. 1991. Clinical Aspects of Acute Rheumatic Fever. *J. Rheumatol (suppl 29)* 18: 2-13
- 21.- Jones, K.F. Y Fischetti, V.A.. 1987. Biological and

- immunochemical identity of M protein on Group G Streptococci with M Protein on Group A streptococci. *Infect. and Immunity* 55: 502-506
22. - Jones, K.F. Y Fischetti, V.A.. 1988. The importance of the location of antibody binding on the M6 protein for opsonization and phagocytosis of group A M6 Streptococci. *J. Exp. Med.* 167: 1114-1123
23. - Jones, K.F., et al.. 1985. Location of variable and conserved epitopes among the multiple serotypes of streptococcal M protein. *J. Exp. Med.* 161: 623-628
24. - Kaplan, M.H. Y Meyesian, M.. 1962. An immunological cross-reaction between group A streptococcal cells and human heart tissue. *Lancet* 1: 706-718
25. - Khandke, k.M., Fairwell, T. Y Manjula, B.N.. 1987. Difference in the structural features of streptococcal M proteins from nephritogenic and Rheumatogenic serotypes. *J. Exp. Med.* 166: 151-162
26. - Kotb, M., Courthey, H.S., Dale, J.B. Y Beachey, E.H.. 1989. Cellular and biochemical response of human T Lymphocytes stimulates with streptococcal M proteins. *J. Immunol.* 142: 966-975
27. - Kraus, W., et al.. 1987. Sequence and type specific immunogenicity of the amino-terminal region of type 1 streptococcal M protein. *J. Immunol.* 139: 3084-3090
28. - Kraus, W., Seyer, J.M. Y Beachey, E.H.. 1989. Vimentin Cross-reactive Epitope of type 12 streptococcal M protein. *Infect. and Immunity.* 57: 2457-2461
29. - Laemmli, K.V.. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, London* 227: 680-685
30. - Lavin, M.M. 1989. La Fiebre Reumática en México, nuevos desafíos, nuevas estrategias. *Arch Inst Cardiol. Mex.* 59: 349-351
31. - Maizel, J.V. *Fundamental Techniques of Virology.* Chap 32, 334 (Academic Press, New York). 1969
32. - Manjula, B.N. Y Fischetti, V.A.. 1980. Studies on group streptococcal M proteins: Purification of type 5-M.

- Protein and comparison of its amino terminal sequence with two immunologically unrelated M-protein molecules. *The J. Immunol.* 124: 261-267
- 33.- Mac Carty, M. 1980. Streptococci. Int Davis, B.D., Dulbecco, R. Microbiology. Including Immunology and molecular Genetics. 3rd. Ed. Philadelphia, Harper and Row Publishers. 602-607
 - 34.- Organización Mundial de la Salud: Serie de informes técnicos. Prevención de la Fiebre Reumática. Ginebra 1986.
 - 35.- Phillips, G.N., et al.. 1981. Streptococcal M protein : α -helical coiled-coil structure and arrangement on the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 4689-4693
 - 36.- Reta, F.M.. 1990. Respuesta Humoral hacia la Proteína M. Exámen Predoctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N. México, D.F
 - 37.- Stollerman, G.H.. 1991. "Short analytical review": Rheumatogenic streptococci and autoimmunity. *Clinical Immunology and Immunopathology.* 61 (parte 2): 131-142
 - 38.- Unry, S.K. Y Middlebrooks, B.L. 1993. Streptococcal Rheumatic carditis. *Microbiol. Rev.* 47: 97-120
 - 39.- Wallace, M.R., et al..1989. The return of acute rheumatic fever in young adults. *JAMA* 262: 2557-2567
 - 40.- Wedege, E., Bryn, K. Y Froholm, O.L. 1988. Restoration of antibody binding to blotted meningococcal outer membrane proteins using various detergents. *Journal of immunological Methods* 113: 51-59
 - 41.- Zabriskie, J.B. Y Freimer, H.E. 1966. An immunological relationship between the group A *Streptococcus* and mammalian muscle. *J. Exp. Med.* 124: 661