

28
Cej.



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

**Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLÁN**



**PROTEINA DE CHOQUE TERMICO DE 55 KDA
DE Klebsiella pneumoniae EN LA ETIO-
LOGIA DE LA ESPONDILITIS ANQUILOSANTE**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A**

MARIO EUGENIO CANCINO DIAZ

Director Q.F.B. Victor Manuel Zendejas Buitrón

Asesor Dr. Ethel García Latorre



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

	Pag.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
Espondiloartropatías.....	2
Espondilitis Anquilosante.....	3
Complejo Principal de Histocompatibilidad.....	6
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	9
Proteínas de Choque Térmico.....	11
OBJETIVOS.....	13
MATERIAL Y METODOS.....	14
A). Materiales.....	14
B). Métodos.....	22
RESULTADOS.....	31
DISCUSION.....	43
CONCLUSIONES.....	49
BIBLIOGRAFIA.....	50

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Pag.
<i>Figura No. 1.</i> Patrón electroforético de <u>K. pneumoniae</u> ((Nasa+ y Nasa-) crecida en diferentes medios de cultivo.....	32
<i>Figura No. 2.</i> Inmunodetección de la p55kp con el suero humano de respuesta intensa en cepas de <u>K. pneumoniae</u> (Nasa+ y Nasa-), crecida en diferentes medios de cultivo.....	33
<i>Figura No. 3.</i> Inmunogenicidad de la p55kp en ratones comprobada por la técnica de IET.	34
<i>Figura No. 4.</i> Reconocimiento de la p55kp por diferentes sueros en extracto total de Kp Nasa negativo.....	36
<i>Figura No. 5.</i> Ausencia de p55kp en <u>M. tuberculosis</u>	37
<i>Figura No. 6.</i> Patrón electroforético de <u>M. tuberculosis</u> y <u>K. pneumoniae</u>	38
<i>Figura No. 7.</i> Patrón electroforético de las enterobacterias.....	39
<i>Figura No. 8.</i> Detección de la p55 por un Ac. monoclonal y por el suero de ratón anti-p55 en todas las enterobacterias por la técnica de IET.....	40
<i>Figura No. 9.</i> Patrón electroforético de algunas estructuras celulares de <u>K. pneumoniae</u>	41
<i>Figura No. 10.</i> Inmunodetección de la p55kp en los diferentes estructuras celulares de <u>K. pneumoniae</u> por el suero de ratón anti-p55.	42
 <i>Tabla No. 1.</i> Resultados de la inmunización de ratones por vía intraperitoneal, con los fragmentos de papel de - nitrocelulosa que contenían la p55kp.....	 35
<i>Tabla del esquema de inmunización de ratones</i>	27
 <i>Diagrama de flujo (metodología)</i>	 30

ABREVIATURAS.

AR	Artritis Reumatoide
AE	Espondilitis Anquilosante
anti-BPHSP	Anticuerpo monoclonal contra proteína de choque térmico de <u>B. pertussis</u> .
DMS	Dimetil-sulfóxido.
IET	Inmunolectrotransferencia
HLA-B27	Antígenos de leucocitos humanos tipo B27.
HSP	Proteína de choque térmico.
HSP60	Familia de proteínas de choque térmico de 60 KDa.
KDa.	Kilo-daltones (Peso Molecular)
Kp	<u>Klebsiella pneumoniae</u> .
Kp Nasa (+)	<u>K. pneumoniae</u> con actividad de nitrogenasa
Kp Nasa (-)	<u>K. pneumoniae</u> sin actividad de nitrogenasa
Medio EN	Medio E de Vogel y Bonner con NH ₄ NaHPO ₄ 4H ₂ O como única fuente de nitrógeno.
Medio ES	Medio E de Vogel y Bonner sin fuente de Nitrógeno.
Medio CST	Medio caldo soya tripticaseína.
MHC	Complejo principal de Histocompatibilidad.
p55Kp	Proteína de 55 KDa de <u>K. pneumoniae</u> .
PAGE-SDS	Electroforesis en geles de poli-acrilamida en condiciones reductoras.
PMC	Proteínas de membrana citoplasmática.
PME	Proteínas de membrana externa.

R E S U M E N

La Espondilitis Anquilosante (EA) es una enfermedad artrítica crónica progresiva inflamatoria que afecta las articulaciones periféricas. Su etiología es aún desconocida pero se encuentra asociada al antígeno de Histocompatibilidad HLA-B27 y a infecciones microbianas principalmente con Klebsiella pneumoniae.

Estudios recientes demuestran que pacientes con EA y sus familiares en 1er. grado, B27 positivos, reconocen intensamente a una proteína de 55 KDa. (p55) en K. pneumoniae por Inmunoelctretransferencia (IET) (14). En éste trabajo la p55Kp fué purificada del papel de nitrocelulosa para inmunizar a ratones obteniéndose una buena producción de anticuerpos. Esta proteína (p55) fué reconocida por un anticuerpo contra la HSP 60 de Bordetella pertussis (Bp) al igual que fué detectada en otras enterobacterias por el monoclonal. La alta inmunogenicidad, la reacción cruzada contra HSP 60 de Bp. y la conservación en toda la familia enterobacteriaceae de la p55, nos indica que es una proteína de choque térmico, que puede estar involucrada en el proceso de autoinmunidad de la EA.

INTRODUCCION

ESFONDILOARTROPATIAS:

Uno de los adelantos más importantes en el campo de la Reumatología en los últimos años es la separación y clasificación de un grupo de enfermedades consideradas por mucho tiempo como variantes de la artritis reumatoide (AR), a las que se les conoce como espondiloartropatías. Esta clasificación se debe en gran parte a la observación clínica, encuestas epidemiológicas, mejor entendimiento en las alteraciones histopatológicas, observación de las diferencias de las alteraciones radiológicas y muy especialmente a los adelantos de la inmunogenética con el descubrimiento del antígeno de histocompatibilidad HLA-B27 en el año 1970 (1).

El término espondiloartropatías fue introducido por Moll en 1974 para designar un grupo de enfermedades caracterizadas por:

- 1) Factor reumatoide negativo
- 2) Ausencia de nódulos reumatoides.
- 3) Inflamación articular periférica.
- 4) Sacroilítis radiológica.
- 5) Sobreposición de alteraciones clínicas.
- 6) Alta asociación con HLA-B27, aumentando la tendencia para la agregación familiar.
- 7) Tendencia a inflamación ocular (conjuntivitis).
- 8) Diversas lesiones mucocutáneas.

Debido a la ausencia del factor reumatoide en el suero de es--

tos pacientes este grupo de enfermedades se ha denominado Espondiloar--
tropatías seronegativas e incluyen:

- 1) Espondilitis anquilosante.
- 2) Artropatía psoriática.
- 3) Artritis reactiva (Síndrome de Reiter)
- 4) Artropatía juvenil crónica (ARJ seronegativa)
- 5) Colitis ulcerativa crónica.
- 6) Enfermedad de Whipple.
- 7) Enfermedad de Crohn.
- 8) Uveítis anterior aguda.
- 9) Enfermedad de Behcet.

El padecimiento más frecuente, y más estudiado que reúne mayor número de similitudes con la AR, es la Espondilitis Anquilosante (EA); por esta razón constituye el prototipo de este grupo de enfermedades. (1,2).

ESPONDILITIS ANQUILOSANTE:

La espondilitis anquilosante (EA) es una enfermedad artrítica crónica progresiva inflamatoria que afecta las articulaciones sacroilia-
cas, la columna vertebral y las grandes articulaciones periféricas. Noventa por ciento de los enfermos son hombres que fluctúan alrededor de la segunda o tercera década de la vida.(3).

El término EA deriva del griego *spōndylos* vértebra y *ankylos* inclinado o encorvado aunque actualmente implica adhesión o fusión.(4)

El trastorno comienza con la presencia de dolor y rigidez en la porción inferior de la espalda, que por lo general es más grave en la mañana. Los síntomas de la enfermedad aguda incluyen dolor e hiper-

sensibilidad en las articulaciones sacroilíacas y espasmo de los músculos paravertebrales. Las manifestaciones en la enfermedad avanzada incluye la anquilosis (fibrosis) de las articulaciones sacroilíacas y de la columna con pérdida de la lordosis lumbar, la cifosis dorsocervical acentuada y la disminución de la expansión del pecho, esto probablemente ocurre como consecuencia del proceso inflamatorio crónico. sin embargo puede no ocurrir en algunos pacientes con enfermedad moderada. También puede observarse artritis periférica, particularmente de las articulaciones axiales, 25% de los pacientes presentan iritis o iridociclitis. La carditis, con o sin aortitis, se observa en 10% de los enfermos, y en 1-4% progresa a insuficiencia de las válvulas aórticas. (8)

Se han formulado algunos criterios clínicos que sirven como ayuda para el diagnóstico de la EA, los cuales son los siguientes:

1) Limitación en la movilidad de la columna lumbar en los 3 planos: flexión, lateral y extensión.

2) Historia o presencia de dolor en la unión dorsolumbar o en la columna lumbar.

3) Limitación en la expansión torácica de 2.5 cm o menos, medida a la altura del 4to. espacio intercostal.

Con la ayuda de radiografías de la pelvis que muestran el grado de sacroilítis y el resultado del laboratorio del factor reumatoide negativo se completan los criterios para diagnosticar EA definida o probable EA según sea el caso. (8)

La diferenciación de la EA de aquellas enfermedades asociadas con sacroilítis y espondilítis, (otras espondiloartropatías) depende de la presencia o ausencia de las características clínicas y radiográficas

de dicha enfermedad. (3)

La etiología precisa de la EA permanece oscura, aunque está bien establecida la predisposición genética asociada al HLA-B27. (3)

La incidencia de este antígeno es cerca del 90% en los pacientes con EA y de 60 a 80% en pacientes con artritis reactiva. A pesar de que se ha demostrado la agregación familiar, los estudios de la susceptibilidad genética no revelan una transmisión mendeliana. Es posible que el antígeno B27 juegue un papel importante en la patogénesis de la enfermedad aunado con otros factores ambientales como infecciones intestinales por enterobacterias especialmente con Klebsiella pneumoniae. La impresión general es que estos microorganismos pueden desencadenar la enfermedad en individuos genéticamente susceptibles. (4,5,6)

La prevalencia e incidencia de EA y HLA-B27 respectivamente fluctúan en la población general de acuerdo con sus características étnicas y raciales. Mientras la prevalencia de EA en caucásicos se encuentra entre 0.5 y 2.3%. En ciertos grupos oscila de 0.7 a 93 por 1000. La frecuencia de HLA-B27 en japoneses, negros norteamericanos y sudafricanos es menor de 4%, en caucásicos británicos y norteamericanos es de alrededor de 8%. En indios norteamericanos la frecuencia del HLA-B27 varía de 23 a 50%. En la población mestiza mexicana que es una mezcla de caucásicos, la mayoría españoles e indios mexicanos, la frecuencia del antígeno es de 5.5%, sin embargo, la prevalencia de EA es desconocida. A pesar de éstas diferencias, existe una verdadera asociación entre la EA y HLA-B27 tanto en caucásicos como en no caucásicos que oscila entre 75% y 100%. Se calcula que entre 68.6% y 80.7% de los mestizos mexicanos con EA tienen el antígeno HLA-B27. (4)

COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Se conoce desde hace tiempo que el éxito de la transfusión sanguínea depende de la compatibilidad entre los grupos sanguíneos del donante y los del receptor. En 1931 Landsteiner sugirió que grupos antigénicos similares podrían intervenir en la aceptación o el rechazo de otros tejidos transplantados. Esta idea condujo a Gorer a identificar en ratones un grupo de antígenos cuya compatibilidad entre el animal donante y el receptor mejoraba de forma notoria la capacidad de supervivencia de un injerto. Por ello, a esos agentes involucrados en el rechazo del injerto se les dió el nombre de antígenos de histocompatibilidad. También se apreció que los productos de una región particular del genoma tenían una importancia predominante en el proceso de rechazo, esta región es el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). En el hombre, dicho complejo está constituido por el grupo de genes HLA (antígenos de los leucocitos humanos), localizados en el cromosoma 6.

Dentro de esta región se hallan codificadas tres grandes grupos de moléculas: a) de clase I, b) de clase II y c) de clase III.

a).-Moléculas de clase I: Los genes humanos de esta clase codifican a las cadenas pesadas de los antígenos HLA-A, -B y -C. Existen por lo menos 18 alelos distintos en el locus HLA-A y por lo menos 32 alelos distintos en el HLA-B. Estos antígenos se componen de una cadena polipeptídica glucosilada con peso molecular de 45000 KDa, asociada de forma no covalente al dominio alfa-3 de la cadena pesada de un péptido no glucosilado (beta 2-microglobulina de 12000 D).

Las células T citotóxicas, involucradas en el reconocimiento y rechazo de células infectadas por virus e injertos, reconocen a estas

moléculas de clase I de las células extrañas y las destruyen para lo cual colaboran con células T cooperadoras (7).

u).- Moléculas de clase II: Los genes humanos de esta clase se arreglan en tres subregiones: DP, DQ y DR, cada uno de las cuales tiene como mínimo, un gen alfa y otro beta. El producto de estos genes da dos cadenas distintas de polipéptidos: la cadena alfa y la beta. Estos péptidos se mantienen unidos entre sí mediante fuerzas no covalentes, y ambas cadenas atraviesan la membrana citoplasmática. Las moléculas de clase II actúan como señales de reconocimiento entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T cooperadores (7).

c).- Moléculas de clase III: La región humana de esta clase comprende los genes para los componentes C2 y factor B del complemento sérico (7).

Como se dijo anteriormente el antígeno HLA-B27 (molécula perteneciente al grupo de antígenos de histocompatibilidad clase I) juega un papel importante en la patogénesis de la EA (8). Para poder confirmar esta suposición se han elaborado varios trabajos de los cuales se han derivado una serie de teorías que tratan de explicar como el antígeno B27 se involucra en la patogénesis de la enfermedad (9).

A continuación se resumen estas teorías:

-- En 1970 se pensaba que otros genes del MHC genéticamente ligados con el antígeno HLA-B27, eran los principales factores de susceptibilidad a la EA; los individuos portadores de estos genes al sufrir infecciones por ciertos microorganismos éstos podían desencadenar la enfermedad. (10)

-- En un reciente simposium internacional celebrado en mayo de 1991 en Oosterbeek en The Netherlands, dos teorías fueron aceptadas para

explicar la asociación de HLA-B27 con EA; éstas suponen que el gen HLA-B27 es artritogénico, y que en asociación con un factor ambiental, causa la enfermedad.

La primera teoría llamada del receptor se basa en la idea propuesta por Zinkernagel y Doherty, donde proponen que las moléculas de clase I presentan antígeno, por lo cual la enfermedad es mediada por linfocitos T. (10,8)

Otra hipótesis de receptor propone que el antígeno HLA-B27 sirve como receptor para ciertos factores liberados por algunos microorganismos especialmente Klebsiella pneumoniae. Esta hipótesis se basa en el trabajo de Saeger y cols 1979, donde reportan que un antisuero obtenido contra Klebsiella causa lisis de linfocitos de pacientes B27 positivos con EA, pero no lisa las células T de pacientes espondilíticos B27 negativos como tampoco las de testigos sanos B27 positivos y negativos (10). Esta hipótesis se refuerza con el trabajo de Sydney quien modificó la capacidad de reconocimiento de células B27 positivas de un individuo sano por incubación con el sobrenadante del cultivo de Klebsiella. Después de la incubación las células tuvieron un comportamiento parecido a la de los pacientes con EA B27 positivos (10). Por lo anterior se deduce que Klebsiella pneumoniae libera en el medio un factor modificante y que solo las células que portan el antígeno B27 pueden ser modificadas por ese factor. (11,8,10)

La segunda teoría corresponde al modelo de mimetismo molecular, propuesto inicialmente en 1976, la cual plantea que varios microorganismos gram-negativos, como Klebsiella pneumoniae y Yersinia presentan antígenos protéicos que dan reacción cruzada con el antígeno HLA-

-B27 (17). En 1987 se demostró una homología del 100% entre los residuos de aminoácidos 72-77 del HLA-B27 y el residuo 188-193 de la enzima nitrógeno reductasa de Klebsiella pneumoniae. En esta teoría el antígeno HLA-B27 está directamente relacionado con el daño al tejido; ya que éste al ser reconocido por anticuerpos desencadena el proceso de inflamación, dando como resultado una respuesta inmune a componentes propios. (10,11)

Estudios bacteriológicos de pacientes con EA en Londres y Arizona demuestran que K. pneumoniae es aislada de las heces de estos pacientes en un 79% durante la fase activa de la enfermedad, la persistencia de el microorganismo en estas personas se cree que genera la producción de anticuerpos cuantitativa y cualitativamente inadecuados para la eliminación de este agente. (hipótesis de tolerancia cruzada, la cual apoya la teoría de mimetismo molecular). Sin embargo existen controversias entre algunos autores para poder asociar a K. pneumoniae con la EA, ya que resultados obtenidos por Van Kregten contradicen la hipótesis anterior. (10,11,12)

KLEBSIELLA PNEUMONIAE.

Klebsiella pneumoniae (Kp) es una bacteria que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos cortos Gram negativos, inmóviles, capsulados que se encuentran en forma aislada, en pares o cadenas, son anaerobios facultativos, crecen en medios con extracto de carne produciendo colonias elevadas, brillantes y mucoides, son oxidasa negativos, pueden utilizar el citrato y glucosa como única fuente de carbono; fermenta glucosa con producción de ácido y gas, la reacción de Voges--

-proskaver es positiva, hidrolisa urea y no produce ácido sulfhídrico (13).

K. pneumoniae forma parte de la flora normal del tracto respiratorio y del intestino del hombre y algunos animales. Se conoce su participación en varios procesos infecciosos, como son: infecciones de vías urinarias y bacteriemias, desarrolladas en pacientes inmunocomprometidos por lo que se le ha denominado como un patógeno oportunista (13).

Su distribución en la naturaleza es ubicua, lo que ha permitido su aislamiento de suelo, aire y agua (13).

K. pneumoniae tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico por medio del complejo enzimático nitrogenasa. Una proteína de este complejo se encuentra posiblemente ligada a la etiología de la EA por presentar similitud antigénica con el antígeno HLA-B27 (21,22). Sin embargo recientemente en el laboratorio de Inmunología I del Depto. de Inmunología de la E.N.C.B. del I.P.N., se ha trabajado con sueros de pacientes con EA y sus familiares sanos tanto B27 positivos como B27 negativos; analizando el perfil de respuesta de anticuerpos por inmunoelectrotransferencia (IET) contra proteínas totales de K. pneumoniae, cepas nitrogenasa positivas y negativas; en donde se ha obtenido una respuesta serológica marcada hacia una proteína de aproximadamente 55 kDa (p55Kp) que no está relacionada directamente con la presencia de la nitrogenasa en la bacteria, pero si tiene relación con la presencia del antígeno HLA-B27 (14).

En el presente trabajo se estudian algunas de las propiedades inmunológicas de ésta proteína de K. pneumoniae (p55Kp), enfocándose hacia la hipótesis de que esta proteína se encuentra relacionada de algún modo a las proteínas de choque térmico.

PROTEINAS DE CHOQUE TERMICO

Las proteínas de choque térmico (HSP) es un grupo de proteínas extraordinariamente bien conservadas en la naturaleza. La inducción o incremento de la síntesis de éstas, tanto en células procarióticas como en eucarióticas se debe en gran parte a una respuesta de estrés provocado por el medio ambiente celular como: cambio en la temperatura, inflamación y fiebre, irradiación, infecciones virales, transformación maligna y exposición a agentes oxidantes, iones de metales pesados, y etanol (29). Estas proteínas presentan varias funciones importantes (tanto en células normales como en células estresadas) basadas principalmente en la capacidad de asociarse con otras proteínas de tal manera que modifica el destino y la función de éstas. Se ha detectado la actividad de ATPasa así como la de protección a cambios de temperatura, daños oxidativos y además están involucradas en la fusión de proteínas de ensamble (29).

Las HSPs han sido agrupadas en diferentes familias basadas en: tamaño (peso molecular), cruce de actividad antigénica, similitud en función y en la secuencia de aminoácidos. Las familias son:

FAMILIA	MIEMBROS
- HSP pequeñas	
- HSP60	HSP65, groEL
- HSP70	HSP70, Bip, hsc70, grp78 dnak
- HSP90	HSP90, HSP83
- HSP110	

La importancia de la inmunología de estas proteínas se debe principalmente a su característica de antígenos inmunodominantes, gran parte de las cuales se encuentran presentes en microorganismos patógenos. En vista del alto grado de similitud entre la secuencia de proteínas de estrés del huésped y del agente infectante, las HSP pueden incluirse en el modelo del mimetismo molecular, trayendo como consecuencia una relación entre infecciones por microorganismos y enfermedades autoinmunes. (29,30,31)

OBJETIVOS

-- Estudiar por Inmunolectrotransferencia (IET), las propiedades inmunológicas de la proteína de 55 KDa de Klebsiella pneumoniae (p55Kp), que es reconocida intensamente en la mayoría de las personas portadoras del antígeno HLA-B27.

-- Mediante los estudios inmunológicos a realizar, demostrar si la p55Kp puede ser agrupada en alguna de las familias de las proteínas de choque térmico.

MATERIALES Y METODOS

AJ.- MATERIALES

I).- MATERIAL BIOLÓGICO

a).- Se trabajaron dos cepas de Klebsiella pneumoniae (nitrogenasa negativo y positivo) aisladas de hemocultivos, las cuales fueron donadas por el Hospital Infantil de México, S.S.A.

b).- Las siguientes enterobacterias: Escherichia coli, Salmonella typhi, Salmonella typhimurium, Shigella sonnei, Enterobacter agglomerans y Yersinia enterocolitica; fueron donadas por el cepario del Departamento de Microbiología de la E.N.C.B. del I.P.N.

c).- Mycobacterium tuberculosis donado por el Instituto Trudeau, E.U.

d).- Sueros humanos: Un suero de paciente con EA portador del antígeno HLA-B27 que da respuesta intensa a la proteína de 55 KDa de K. pneumoniae y un suero testigo de respuesta débil, de un sujeto sano (HLA-B27 negativo).

e).- Suero de ratón hiperinmune, anti-p55kp obtenido por inmunización de ratones.

f).- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína de choque térmico de Bordetella pertussis (anti-RPHSP), donado por Juan L. Arciniega de la Division of Bacterial Products, Center for Biologics Evaluation and Research, (E.U.).

h).- Inmunoglobulina G (IgG) de cabra anti-inmunoglobulinas totales de humano y de ratón (IgA, IgM e IgG) conjugadas a peroxidasa (Cappel).

1).- Ratones de cepa abierta donados por el bioterio del Dpto. de Farmacia de la E.N.C.B. del I.P.N.

(I).- MATERIAL QUIMICO Y EQUIPO

a).- Medios de cultivo:

1).- Agar de Soya tripticaseína y Base de agar sangre (BIOXON)

2).- Caldo de Soya tripticaseína (BIOXON)

3).- Medio E de Vogel y Bonner con iones amonio (NH₄⁺) como fuente de nitrógeno (EN):

MgSO ₄	0.2	g
Acido Citrico	2.0	g
NH ₄ NaHPO ₄ 4H ₂ O	3.5	g
K ₂ HPO ₄	10.0	g
Glucosa	5.0	g
Agua destilada hasta	1	litro

4).- Medio E. de Vogel y Bonner modificado sin fuentes de nitrógeno (ES):

MgSO ₄	0.2	g
Acido Citrico	2.0	g
K ₂ HPO ₄	10.0	g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	2.3	g
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.02	g
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.1	g
Glucosa	15.0	g
Agua destilada hasta	1	litro

Los reactivos para los medios de cultivo EN y ES de

Merck.

4.- Reactivos y equipo para desarrollar la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (PAGE-SDS). Todos los reactivos de Sigma Chemical Co. los solventes de Baker, S.A. Una vez preparados se filtran en papel Whatman No.1 y se guardan a 4 grados centígrados.

- 1).- Solución de monómeros acrilamida-bisacrilamida (30.8%).

Acrilamida	30.0	g
Bis-acrilamida	0.8	g
Aqua bidestilada hasta	100	ml.

- 2).- Regulador del gel separador (Tris-HCl 1.5 M, pH=8.8)

Trizma base	18.15	g
Aqua bidestilada	90.0	ml

Se ajusta pH=8.8 con HCl concentrado
Se afora con agua bidestilada a 100 ml.

- 3).- Regulador del gel concentrador (Tris-HCl 0.5M pH=6.8).

Trizma base	3.0	g
Aqua bidestilada	90.0	ml

Se ajusta el pH=6.8 con HCl concentrado
Se afora con agua bidestilada a 100 ml

- 4).- Lauril sulfato de sodio (SDS) al 10%.

SDS	10.0	g
Aqua bidestilada hasta	100.0	ml

- 5).- Persulfato de amonio al 10%.

Persulfato de amonio	20.0	mg
agua bidestilada	200.0	ul

- 6).- TEMED. (N.N.N.N-tetrametilendiamina). Sigma. Co.

7).- Regulador de corrimiento (Tris 0.025M-Glicina 0.192M-SDS al 0.1%, pH=8.3). No se ajusta el pH.

Trizma base	3.0	g
Glicina	14.4	g
SDS.al 10%	10.0	ml
Agua bidestilada hasta 1 litro.		

8).- Regulador de muestra 2X.

Tris 0.5M, pH=6.8	2.5	ml
SDS al 10%	4.0	ml
agua bidestilada	0.5	ml
Glicerol	2.0	ml
2-mercaptoetanol	1.0	ml

Se agregan unos cristales de azul de bromofenol

9).- Solución madre de azul de Coomassie para tinción de proteínas en geles.

Azul Coomassie R250	2.0	g
Agua destilada	200.0	ml

10).- Colorante de trabajo para tinción de proteínas.

Sol. madre de Azul Coomassie	62.5	ml
Metanol absoluto	250.0	ml
Ac. acético glacial	50.0	ml
Agua destilada	137.5	ml

11).- Decolorante para gel I.

Metanol absoluto	500.0	ml
Ac. acético glacial	100.0	ml
Agua destilada	400.0	ml

12).- Decolorante para gel II. (Solución conservadora).

Ac. acético glacial	7.0	ml
Agua destilada	93.0	ml

13).- Marcadores de peso molecular. MW-SDS-70L de Sigma chemical Co.

PROTEINAS	KDa.
Albumina bovina	66
Ovalbumina	45
Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	36
Anhidrasa carbónica	29
Tripsinógeno	24
Inhibidor de tripsina	20.1
Alfa-lactoalbumina	14.2

14).- Equipo para desarrollar la técnica.

- Equipo para electroforesis vertical Hoefer Scientific Instruments.
- Fuente de poder para electroforesis Hoefer Scientific Instruments.

c).- Reactivos y equipo para desarrollar la técnica de transferencia de proteínas. Todos los reactivos de Sigma, Co. y solventes de Baker.

1).- Regulador de transferencia.

Trizma base	9.07	g
Glicina	43.2	g
Metanol absoluto	600.0	ml
Aqua bidestilada	2400.0	ml

2).- Tinción de proteínas transferidas.

Tinta china (Pelikan)	20.0	ul
PBS 0.1M, Tween 20 al 0.3%. pH=7.2	10.0	ml

3).- Equipo para desarrollar la técnica.

- Cámara de electrotransferencia. Hoefer. Sci. Inst.
- Fuente de poder. Hoefer Sci. Inst.
- Papel de nitrocelulosa de 0.45 micras de poro.

4).- Reactivos y equipo para desarrollar la técnica de inmunodetección. Todos los reactivos de Sigma, Co. y solventes de Baker, S.A.

1).- Regulador salina-fosfatos (PBS) 10X. 0.1M. pH=7.2

NaCl	80.0	g
KH ₂ PO ₄	2.0	g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	29.0	g
KCl	2.0	g
Agua bidestilada hasta	1000.0	ml

2).- Regulador de bloqueo

Gelatina	6.25	g
Disolver en 200 ml de agua bidestilada caliente		
EDTA disódico	4.54	g
PBS 10X	250.0	ml
Tween 20	2.5	ml
Agua bidestilada	1.5	L
Ajustar el pH=7.3		
Aforar con agua hasta	2.5	L

3).- Regulador de lavado PBS-Tween 20 al 0.1%

PBS 10 X	100.0	ml
Tween 20	1.0	ml
Agua destilada	900.0	ml

4).- Sustrato para la peroxidasa

4-cloro-1-naftol	30.0	mg
Metanol absoluto	10.0	ml
PBS 1X	50.0	ml
H2O2	50.0	ul

e).- Reactivos para la obtención de las proteínas de membrana externa (PME).

1).- HEPES (Acido 2-N-hidroxiethyl piperazina 2-N-etano-- sulfónico). 0.01M, pH 7.4.

HEPES	2.3	g
Agua bidestilada	900.0	ml
Ajustar pH=7.4		
Aqua hasta	1000.0	ml

2).- HEPES 0.01M - tritón X-100 al 2%

HEPES 0.01M	98.0	ml
Tritón X-100	2.0	ml

3).- Tris (Hidroxiometil amino metano) 0.05M - EDTA (tetra- len diamino tetracetato) 0.05M, pH 7.8.

Trizma base	0.6	g
EDTA	1.8	g
Agua bidestilada	90.0	ml
Ajustar el pH=7.8		
Aforar con agua hasta	100.0	ml

4).- Tris 0.05M - EDTA 0.05M - tritón X-100 al 2%

Tritón X-100	2.0	ml
Tris 0.05M - EDTA 0.05M		
hasta aforar con	100.0	ml

- 5).- Cloruro de Magnesio (MgCl₂) 1M.
- 6).- Ribonucleasa de *Aspergillus clavatus*. Sigma Co.
- 7).- Desoxiribonucleasa de páncreas bovino. Sigma Co.
- 8).- Reactivos para la determinación de proteínas por el método de Lowry.
- 9).- Reactivos para la inmunización de animales.
- 10).- Dimetil sulfóxido. de Sigma chemical Co.

B. - METODOS

1).- Conservación v crecimiento de las cepas bacterianas trabajadas.

Todas las cepas estudiadas fueron crecidas v trabajadas por separado de la siguiente manera.

a).- Las bacterias se conservaron en tubos inclinados que contenían base de agar sangre, en refrigeración.

b).- De un tubo con agar inclinado se tomó una asada de bacteria, se hizo crecer en cajas de petri con agar de soya tripticaseína a 37 C por 18 horas.

c).- Se inocularon dos tubos de ensaye que contenían 10 ml cada uno del medio de cultivo correspondiente, y se dejaron crecer a las condiciones óptimas de temperatura v tiempo para cada cepa bacteriana; como sigue:

K. pneumoniae cepa nitrogenasa positiva se hizo crecer en medio (ES) sin fuente de nitrógeno a temperatura ambiente durante cinco días.

K. pneumoniae cepa nitrogenasa positiva se hizo crecer en medio (EN) con fuente de nitrógeno a 37 C durante cinco horas.

K. pneumoniae cepas nitrogenasa negativa se creció en medio (EN) a 37 C durante cinco horas.

Todas las demás enterobacterias estudiadas se hicieron crecer en caldo de soya tripticaseína a 37 C durante 18 horas.

d).- Pasado el tiempo de crecimiento el contenido de los dos tubos (20ml) sirvió para inocular un matraz que contenía 500 ml de medio de cultivo correspondiente para cada bacteria.

e).- Se cosechó el cultivo bacteriano por centrifugación a 6000 rpm durante 20 minutos en una centrífuga Sorvall RC-5B, descartándose el sobrenadante y obteniéndose el paquete celular.

2).- Tratamiento de la muestra para su análisis electroforético.

a).- El paquete celular obtenido de la cosecha, se lavó

tres veces con solución salina al 0.85% por centrifugación a 6000 rpm durante 20 minutos.

b).- El paquete celular se ajustó con solución salina al 0.85% a una densidad optica de 0.8 en un fotocolorimetro a 540 nm.

c).- Esta suspensión bacteriana ajustada se dividió en alícuotas de 5 ml., las cuales fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 25 minutos.

d).- El sobrenadante fué descartado y el paquete celular se conservó en congelación hasta su uso.

e).- A cada tubo que contenía el paquete celular se le agregó 250 ul de regulador de muestra 2X e inmediatamente después se colocó en baño de agua hirviendo durante 10 minutos.

f).- La muestra fué centrifugada para eliminar restos celulares gruesos.

g).- El sobrenadante obtenido corresponde a la muestra bacteriana usada en el análisis electroforético.

Para Mycobacterium tuberculosis la masa bacteriana fué sometida a sonicación por 30 minutos; se obtuvo un extracto crudo, el cual se diluyó con regulador de muestra 1X volumen a volumen para su análisis electroforético.

3).- Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras (PAGE-SDS).

Todos los geles fueron preparados a una concentración final de acrilamida del 12% con un grosor de 1.5 mm; utilizando el sistema de reguladores discontinuos de Laemmli. (15)

a).- Se montó el aparato de acuerdo a las instrucciones del fabricante perfectamente limpio y desengrasado.

b).- Se elaboró el gel separador mediante la mezcla de los siguientes reactivos:

REACTIVO	ml/gel
Sol. de monómeros	12.0
Tris 1.5M. pH=8.8	7.5
SDS al 10%	0.6
Aqua bidestilada	10.0
Persulfato de amonio	0.2
TEMED	0.015

c).- Se vació rápidamente la mezcla anterior entre las placas de vidrio con la ayuda de una jeringa, hasta 4 cm abajo del borde superior e inmediatamente después se agregó una capa de agua bidestilada haciéndola deslizarse suavemente.

d).- Se dejó que polimerizara durante unos minutos. el gel concentrador se realizó de la siguiente manera:

REACTIVO	ml/gel
Sol. de monómeros	1.33
Tris 0.5M. pH=6.8	2.5
SDS al 10%	0.20
Aqua bidestilada	6.10
Persulfato de amonio	0.07
TEMED	0.007

e).- La mezcla fué vaciada sobre el gel separador ya polimerizado e inmediatamente después se colocó el peine ciego o de diez carriles según el caso y se dejó polimerizar durante unos minutos.

f).- Se montaron los geles en el aparato y se sellaron a presión evitando la fuga de líquidos en la cámara.

g).- Se llenaron los tanques con regulador de corrimiento y se colocaron las muestras en los carriles según el caso, se aplicó una corriente constante de 15 mA hasta que la marca del frente iónico penetrará en el gel separador para después aumentar la corriente a 30 mA.

4).- Electrotransferencia de proteínas por la técnica de Towbin (6)

a).- Se humedecieron en regulador de transferencia 3 pedazos de papel filtro del mismo tamaño al igual que un pedazo de papel de nitrocelulosa de 0.45 μ m de poro.

b).- Se tomó un cassette del aparato de electrotransferencia y se colocó una esponja (Scotch Brite) humedecida sobre el mismo. Sobre la esponja se colocó un pedazo de papel filtro y sobre éste se colocó el papel de nitrocelulosa. Sobre el papel de nitrocelulosa se colocó el gel que contenía las proteínas ya separadas por electroforesis teniendo cuidado de no dejar atrapadas burbujas entre el gel y el papel. Se hicieron las marcas necesarias con un lápiz y se colocaron 2 pedazos de papel filtro sobre el gel. Enseguida se puso la otra parte del cassette y se cerró aprisionándolo firmemente.

c).- Se colocó el cassette en la cámara de transferencia la cual contenía el regulador de transferencia y se conectaron los electrodos de tal manera que el cátodo (polo negativo) quedó del lado del gel.

d).- Se conectó el sistema a la fuente de poder, colocando una corriente de 100 mA. durante 12 horas.

e).- Las proteínas transferidas en el papel se pudieron detectar, así como los marcadores de peso molecular al ser teñidas con solución de tinta china.

5).- Inmunodetección.

a).- Los pedazos de papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas de cada ensayo se colocaron en regulador de bloqueo a 37 C durante 2 horas y después a 4 C toda la noche.

b).- Después del bloqueo el papel se recubrió con una cantidad mínima necesaria de regulador de bloqueo que contenía el suero problema a ensayar diluido 1:50, y se incubó por 1 hora a 37 C y después toda la noche a 4 C.

c).- Se lavó 10 veces con PBS-T 0.1%.

d).- Se agregó una cantidad mínima necesaria del conjugado de peroxidasa- IgG de cabra anti-Ig totales humanas o de ratón según el caso a la dilución de 1:1000 en regulador de bloqueo y se incubó 2 horas a 37 C.

e).- Se hicieron 7 lavados con PBS-T y después 10 lavados con PBS sin Tween 20.

f).- Se agregó el sustrato de la peroxidasa y se incubó hasta la aparición de las bandas.

g).- Se retiró el sustrato y se lavó con agua de la llave y se dejó secar para su posterior análisis.

6).- Obtención de la proteína de 55 KDa. de K. pneumoniae. (p55Kp).

a).- Se tomaron 2 tubos con paquete bacteriano de K. pneumoniae (cepa nitroreductasa negativa), provenientes de una suspensión bacteriana ajustada a una D.O. de 0.8 en un volumen de 5 ml. al cual se le agregó 250 ul de regulador de muestra 2X. Se agitó y se colocó en baño María durante 15 minutos.

b).- Se mezcló el contenido de cada tubo haciendo un total de 500 ul de muestra.

c).- Los 500 ul de muestra fueron colocados en un gel con peine ciego de tamaño de 14x16 cm. de 1.5 mm de grosor (al 12%) para su corrimiento electroforético.

d).- Las proteínas contenidas en el gel fueron transferidas a un papel de nitrocelulosa .

e).- La porción del papel que contenía las proteínas, fué cortada en ambos extremos en pequeñas tiras para poder detectar por medio de una inmunodetección la p55Kp, utilizando un suero de respuesta intensa para esta proteína.

f).- Una vez detectada esta banda, ambas tiras fueron perfectamente bien centradas junto al papel de donde provenían, para cortar el fragmento de papel que contenía a esta proteína.

g).- Este fragmento de papel fué disuelto en 1 ml. de dimetil sulfóxido y guardado en congelación hasta su uso.

El procedimiento anterior fué hecho hasta obtener un total de 8 fragmentos de gel los cuales se disolvieron en 7 ml de dimetil sulfóxido.

7).- Inmunización de animales.

El siguiente esquema de inmunización está basado en el trabajo presentado por Minoru Ogasawara. (17). Considerando que:

-- Una fracción de gel equivale a un fragmento de papel de nitrocelulosa que contiene la p55KP.

-- En 7 ml de dimetil sulfóxido (DMS) se encuentran disueltos 8 fragmentos de papel de nitrocelulosa que contienen la p55KP.

ESQUEMA DE INMUNIZACION DE RATONES

LOTE No. de ratones	Dosis total del Ag. en (fracciones de gel)	(ml de (DMS) por ratón)	
		1ra. Inmunización Dia 0	2da. Inmunización Dia 15
I (3)	0.30	0.131	0.131
II (6)	0.60	0.260	0.260
III (3)	1.00	0.430	0.430
IV (4)	--	--	--

Los ratones fueron sangrados una semana después de la segunda inmunización (día 22).

8).- Obtención de proteínas de membrana externa (PME).

Se siguió el método de Schnaitman con algunas modificaciones:
(18). Trabajándose con K. pneumoniae cepa nitrogenasa negativo.

a).- Del paquete bacteriano previamente cosechado y lavado 3 veces con solución salina al 0.85%, se tomó una porción para ser re-suspendido en HEPES 0.01M (pH=7.4) hasta dar una densidad óptica de 1.0 en un fotocolorímetro a 540 nm.

b).-Un volumen de 250 ml de esta suspensión se sometió a sonicación durante 25 minutos en un sonicador (Heat Systems Sonicator) a intervalos de 5 minutos obteniéndose una disminución de la D.O. a 0.4.

c).- Rotas la células se centrifugó 3 veces a 3020 g durante 10 min. para eliminar las bacterias completas. El sobrenadante obtenido corresponde al extracto crudo al cual se le agregaron las soluciones de ribonucleasa, desoxirribonucleasa y de 1 a 2 gotas de solución de $MgCl_2$ 1M por cada 10 ml de suspensión, dejando actuar a estas enzimas durante 15 minutos a 37 C.

d).- El extracto crudo se centrifugó a 150,000 g por 45 min. a 4 C en una centrifuga Beckman LB-80 para la obtención de las envolturas celulares, el sobrenadante contenía las proteínas citoplasmáticas.

e).- El sedimento se resuspendió en HEPES 0.01M-tritón X-1-- al 2%. Se homogenizó en un potter y se centrifugó a 140,000 g por 45 minutos a 4 C con el fin de solubilizar las proteínas de la membrana citoplásmica.

f).- El sedimento se resuspendió en tris 0.05M-EDTA 0.05M tritón X-100 al 2%. Se homogenizó en un potter y se incubó a 37 C por 15 minutos en una estufa con el fin de solubilizar las PME.

g).- Posteriormente se centrifugó a 140,000 g por 45 minutos a 37 C y se conservó el sobrenadante que corresponde a las PME solubilizadas en tritón -X-100-EDTA.

h).- Se determinó la concentración de proteínas de las fracciones obtenidas en cada paso por el método de Lowry.

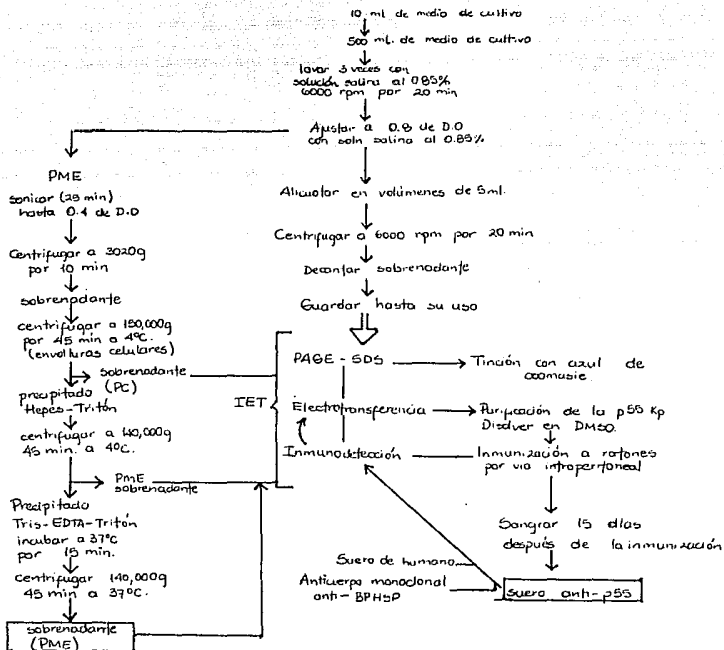
i).- Para su análisis electroforético las fracciones de proteínas de: citoplasma, de membrana citoplasmática y de membrana externa, fueron precipitadas con 6 volúmenes de acetona fría dejándolas por 12 horas a -20 C.

j).) Posteriormente se centrifugó a 12,000 g durante 15 minutos a 4 C obteniéndose un precipitado el cual fue solubilizado con cierta cantidad de regulador de muestra 1X para obtener una concentración final de 1 mg/ml.

k).- Las muestras fueron colocadas en baño María durante 5 minutos e inmediatamente fueron guardadas en congelación para su posterior uso.

9).- Se realizaron inmunoelectrotransferencias con diversas combinaciones de variables para estudiar las propiedades inmunológicas de la p55Kp.

METODOLOGIA
DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

Todas las figuras que se muestran a continuación corresponden a las electroforesis en geles de poliacrilamida e inmunodetecciones desarrolladas para el estudio inmunológico de la p55Kp.

Se inició el estudio inmunológico de la p55 haciendo crecer las dos cepas diferentes de Klebsiella pneumoniae (Nasa + y Nasa -) en diferentes medios: Medio pobre sin fuente de nitrógeno (ES), medio con fuente de nitrógeno (EN) y medio rico Caldo Soya Trypticaselna (CST). El patrón electroforético (Figura No.1) muestra que existe diferencia en el contenido proteico de ambas cepas bacterianas. La figura No. 2 muestra que la p55 está presente en ambas cepas.

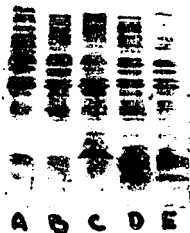


Figura No.1. Patrón electroforético de Klebsiella pneumoniae (Kp) (Nasa + y Nasa -) crecida en diferentes medios de cultivo.

Carril A	Kp. Nasa. negativo	crecida en medio EN
Carril B	Kp. Nasa. positivo	crecida en medio EN
Carril C	Kp. Nasa. positivo	crecida en medio ES
Carril D	Kp. Nasa. positivo	crecida en medio (CST)
Carril E	Kp. Nasa. negativo	crecida en medio (CST)

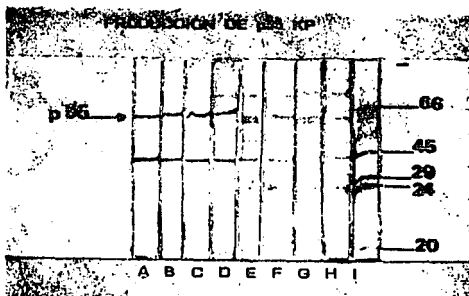


Figura No. 2. Inmunodetección de la p55Kp con el suero de humano de respuesta intensa en cepas de Klebsiella pneumoniae (kp) (Nasa + v Nasa -) crecida en diferentes medios.

Carril I Marcadores de peso molecular

Sueros

Carril A al D Suero de humano con respuesta intensa

Carril E al H Suero de humano con respuesta debil

Extracto

Carril A y E Kp. Nasa negativo crecida en medio EN

Carril B v F Kp. Nasa negativo crecida en medio (CST)

Carril D v H Kp. Nasa positivo crecida en medio (CST)

Carril C v G Kp. Nasa positivo crecida en medio EN

Por otra parte la inmunogenicidad de la p55 en ratones fué comprobada por la técnica de Inmunolectrotransferencia (IET). Los sueros de los ratones que respondieron a la inmunización mostraron una intensa banda de reconocimiento después de la inmunización no así con los sueros preinmunes (Figura No. 3). La tabla I resume los resultados de las diferentes lotes de inmunización utilizados para este propósito. El suero obtenido de estos ratones sirvió como reactivo (denominado suero de ratón Anti-p55) para los siguientes experimentos.

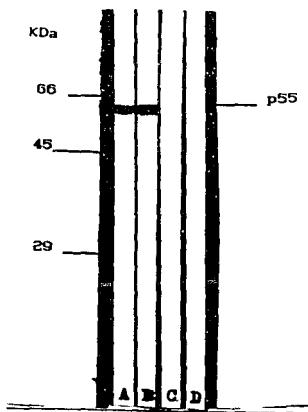


Figura No. 3. Inmunogenicidad de la p55K₀ en ratones comprobada por la técnica de IET.

Sueros

Carril A y B Suero de ratón inmunizado
 Carril C y D Suero de ratón preinmune

Extracto

Carril A,B,C y D. Kp. Nasa. negativo.

Tabla I. Resultados de la inmunización de ratones por vía intraperitoneal, con los fragmentos de papel de nitrocelulosa que contenía la p55Kp.

Lote	Dosis total del antígeno en fracciones de gel	Numero de ratones que respondieron
1	0.3	1 DE 3
2	0.6	4 DE 6
3	10	2 DE 3
4	0.0	0 DE 4

Se encontró que un anticuerpo monoclonal Anti-Bp HSP reconoció a la p55 de igual manera que el suero humano de respuesta intensa y el suero de ratón Anti-p55 (Figura No.4). Ohtenido este resultado se buscó la inmunodetección por el monoclonal de ésta misma proteína en extracto total de Mycobacterium tuberculosis. La Figura No. 5 muestra que no está presente la p55 en esta bacteria y la figura No. 6 comprueba la existencia de proteínas en el extracto total de Mycobacterium tuberculosis.

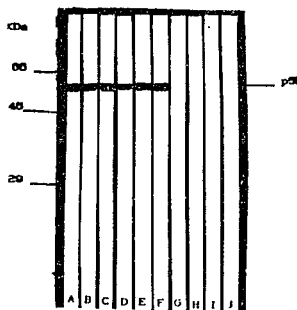


Figura No. 4. Reconocimiento de la p55Kp. por diferentes sueros en extracto total de Klebsiella pneumoniae Nasa negativo.

Sueros

- Carril A y B Suero humano con respuesta intensa
- Carril C y D Suero de ratón anti-p55Kp.
- Carril E y F Anticuerpo monoclonal anti-BP SHP.
- Carril G y H Suero de ratón preinmunune.
- Carril I y J Suero de humano con respuesta debil.

Extracto

- Carril A,B,C,D,E,F,G,H,I y J Kp. Nasa. negativa.

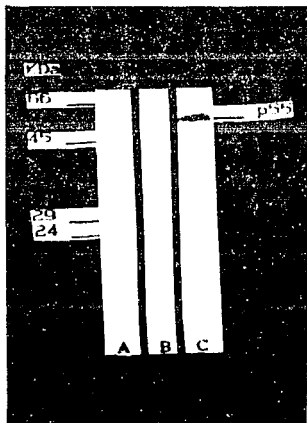


Figura No. 5. Ausencia de p55Kp en M. tuberculosis.

Suero

Carril A, B y C Anticuerpo monoclonal anti-BP HSP.

Extracto

Carril A y B Mycobacterium tuberculosis.

Carril C Klebsiella pneumoniae.



Figura No. 6. Patrón electroforético de M. tuberculosis y K. pneumoniae.

Carril A K. pneumoniae
Carril B y C M. tuberculosis.

Cada una de las enterobacterias trabajadas presentó un patrón electroforético diferente (Figura No.7); por lo que se buscó en todas estas bacterias la p55, la cual fué inmunodetectada tanto con el monoclonal como con el suero de ratón Anti-p55 en todas las bacterias ensayadas. (Figura No. 8).

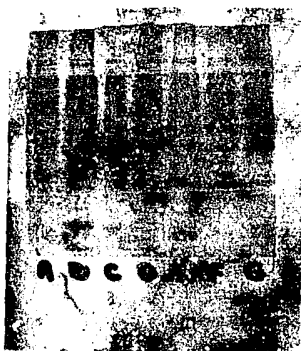


Figura No. 7. Patrón electroforético de las Enterobacterias, se observa la diferencia en el contenido proteico de cada bacteria.

Carril A E. coli
Carril B Enterobacter agglomerans
Carril C Salmonella typhi
Carril D Salmonella typhimurium
Carril E Shigella sonnei
Carril F Yersinia enterocolitica
Carril G K. pneumoniae.

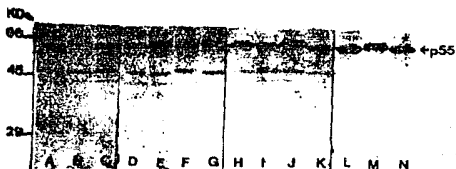


Figura No. 8. Detección de la p55 por el monoclonal y suero de ratón Anti-p55 en todas las enterobacterias ensayadas utilizando la técnica de IET.

Sueros

Carril A al G Suero de ratón Anti-p55

Carril H al N Anticuerpo monoclonal Anti-Bp HSP

Extracto

Carril D y N E. coli

Carril F y L S. typhi

Carril C e I S. typhimurium

Carril B y J Shigella sonnei

Carril E y M Enterobacter agglomerans

Carril A y K Yersinia enterocolitica

Carril G y H K. pneumoniae

Otro experimento planteado para este trabajo fue la obtención de las fracciones proteicas de los diferentes compartimentos celulares bacterianos. la Figura No. 9 muestra el patrón electroforético de estas fracciones; la p55 fue detectada por el suero de ratón anti-p55 en las fracciones proteicas de : Citoplasma, Membrana citoplasmática y total de K. pneumoniae, pero no en la fracción proteica de la membrana externa Figura No. 10.



Figura No. 9 Patrón electroforético de las fracciones proteicas celulares de K. pneumoniae.

Carril	A	Marcadores de peso molecular
Carril	B	Proteinas citoplasmáticas
Carril	C y F	Extracto total de <u>K. pneumoniae</u>
Carril	D	Proteinas de membrana citoplasmática
Carril	E	Proteinas de membrana externa.
Carril	G	Sedimento sobrante.

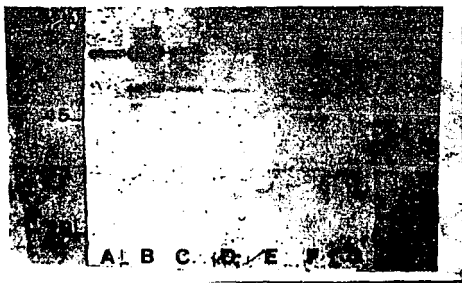


Figura No. 10. Inmunodetección de la p55Kp en los diferentes compartimientos celulares de K. pneumoniae por el suero de ratón Anti-p55.

Suero

Carril A,B,C,D,F y G Suero de ratón anti-p55Kp.

Extracto

Carril A y E Proteínas citoplasmáticas
 Carril B y F Extracto total de K. pneumoniae
 Carril C Proteínas de membrana citoplasmática
 Carril D Proteínas de membrana externa.
 Carril G Sedimento sobrante.

DISCUSION

Este trabajo es la continuación de un proyecto que se está desarrollando en el Laboratorio de Inmunoquímica I del Depto. de Inmunología de la E.N.C.B. del I.P.N.. Estos estudios tratan de encontrar una relación inmunológica entre las proteínas de K. pneumoniae y la Espondilitis Anquilosante. Los resultados obtenidos mediante el análisis por inmunoelectrotransferencia han demostrado que una proteína de K. pneumoniae de aproximadamente 55 kDa es reconocida intensamente por sueros de sujetos portadores del antígeno HLA-B27 sin importar si la cepa bacteriana ensayada presenta o no la actividad de fijación del nitrógeno. (19,14) Estos hallazgos se oponen de una forma indirecta a la hipótesis del mimetismo molecular apoyada en la similitud antigénica entre la enzima nitrogenasa de K. pneumoniae y el antígeno HLA-B27 que reportan algunos autores. (20,21,22). Sin embargo la alta asociación entre la EA y el antígeno HLA-B27 (23,24,25) nos podría orientar para relacionar esta proteína (p55Kp) con la enfermedad.

A continuación se discuten los resultados obtenidos de los estudios inmunológicos para la p55Kp.

La figura No.1 nos indica que existen diferencias en el contenido protéico de una misma cepa bacteriana cuando es crecida en un medio de cultivo diferente, lo cual nos llevó a pensar que a ciertas condiciones de cultivo posiblemente la p55Kp podría estar o no presente; sin embargo al analizar los resultados que nos muestra la figura No.2 se observa que la p55Kp siempre se encuentra en la bacteria, ya que esta fue reconocida por el suero con respuesta intensa en bacterias crecidas

en los tres medios diferentes, además se puede observar que la p55Kp no tiene relación con la actividad de fijación del nitrógeno, porque tanto en cepas nitrogenasa positivas como nitrogenasa negativas fué detectada. Estos resultados nos indican que la p55Kp no es la enzima nitrogenasa y que ésta corresponde a una proteína constitutiva de la bacteria.

Por otro lado al ser probada la inmunogenicidad de la p55Kp; se encontró que esta proteína al ser inoculada en ratones por vía intraperitoneal, induce la producción de anticuerpos anti-p55Kp los cuales fueron detectados por inmunodetección, (el resultado se muestra en la figura No.3). Para esto fueron probadas tres dosis diferentes de antígeno para la inmunización, y no se encontró diferencia alguna entre estas ya que la mayoría de los ratones tuvieron una buena respuesta de anticuerpos como se puede observar en la tabla I. Debido a que se trabajó con una cepa abierta de ratones; y que se manejaron muy pequeñas cantidades de antígeno para la inmunización, algunos ratones no respondieron.

Con lo anterior se demostró que la p55Kp es un buen inmunógeno en ratones lo cual indica que esta proteína posiblemente este involucrada en los procesos inmunológicos de la EA; basándose en que algunos autores han encontrado que sueros de pacientes espondilíticos presentan una hipergamaglobulemia con anticuerpos dirigidos contra K. pneumoniae. (26,27)

Por otra parte se trabajó con un anticuerpo monoclonal (anti-BPHSP), que reconoce a una proteína de choque térmico de 63 KDa de Bordetella pertussis, la cual presenta similitud estructural con

el grupo de las proteínas de choque térmico de GroE) de E. coli. (28) Este anticuerpo monoclonal al igual que el suero de ratón anti-p55Kp y el suero humano con respuesta intensa, se enfrentaron con extracto total de K. pneumoniae nitrogenasa negativa; se observó que el anticuerpo monoclonal reconoció a la misma proteína que es reconocida por los sueros anti-p55Kp de humano y de ratón, como se ve en la figura No.4.

Este cruce antigénico entre el anticuerpo monoclonal (anti-BPHSP) y la p55Kp.: nos lleva a pensar que la p55Kp posiblemente corresponda a una proteína de choque térmico de K. pneumoniae; aunque en los resultados anteriores se demostró que p55Kp es una proteína constitutiva de la bacteria, no se descarta la posibilidad de que sea de choque térmico ya que ciertos autores han detectado la presencia de estas proteínas aún en células no estresadas; como es el caso de la HSP60 de E. coli que en condiciones normales de crecimiento se encuentra en 1.6% del total de proteínas celulares, aumentando a 15% cuando esta bacteria es estresada. (29,30) Además otra de las características de las HSPs es la de ser antígenos altamente inmunogénicos (antígenos inmunodominantes); (31,32) característica idéntica de la p55Kp que se demostró en los animales trabajados.

Varios estudios demuestran la respuesta inmunológica hacia las HSPs especialmente las que corresponde a la familia de HSP60 que se han encontrado involucradas principalmente en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias crónicas. Una HSP de 60 KDa de Borrelia burgdorferi se asocia con la artritis Lyme. (33) La artritis reumatoide (AR) en humano y artritis por adyuvante en ratas (como modelo animal en el laboratorio) son las más estudiadas actualmente; se ha encontrado que

una proteína que corresponde a la familia de HSP60, (proteína de 65 KDa de Mycobacterium tuberculosis) provoca la proliferación de células T con receptor gamma y delta de pacientes con AR y de personas con historia clínica de tuberculosis. (30,31,34,35) Ahora bien la EA es una enfermedad inflamatoria crónica cuya etiología es desconocida, pero asociada a factores genéticos y ambientales; como uno más de estos factores ambientales considerados hasta el momento podemos agregar a la p55Kp como una proteína de choque térmico que puede desencadenar una respuesta autoinmune por mimetismo molecular parecida a la HSP65 de Mycobacterium tuberculosis que genera la artritis por adyuvante en ratas y la AR en humanos. de igual manera la p55Kp puede generar la EA en humano.

La p55Kp la podemos incluir como un miembro más de la familia de HSP60 por compartir similitud antigénica y tamaño con el grupo de las proteínas parecidas a groEL de E. coli. (30) Aunque p55Kp es diferente antigénicamente con la HSP de 65 KDa de M. tuberculosis (que pertenece a esta misma familia), como lo muestran las figuras Nos. 5 y 6 no se puede descartar la posibilidad de que esta proteína tenga el mismo papel en la generación de la enfermedad autoinmune como posiblemente sea la E.A.

Por otro lado existen reportes de que algunas enterobacterias aparte de la K. pneumoniae, se encuentran relacionadas también con la EA y el antígeno HLA-B27, como son: Yersinia enterocolitica (37) Shigella flexneri, (38) y E. coli, (6) entre otras. Esta asociación se basa en los cruces antigénicos que presentan ciertas proteínas de estas bacterias con anticuerpos monoclonales anti-HLA-B27 (B27M1 y B27M2). La figura No. 7 muestra la diferencia entre los patrones electroforéticos

protéicos de las bacterias: E. coli, Salmonella typhi, S. typhimurium, Shigella sonnei, Enterobacter agglomerans, Yersinia enterocolitica v K. pneumoniae; las cuales se enfrentaron con los sueros de ratón anti-p55Kp y el anticuerpo monoclonal anti-BPHSP para comprobar si la p55Kp es común en las demás bacterias de la familia a la que pertenece K. pneumoniae. La figura No. 8 muestra que p55Kp es detectada tanto con el anticuerpo monoclonal como con el suero de ratón anti-p55Kp en todas las bacterias antes mencionadas; lo cual demuestra que la p55Kp es conservada en la mayoría de las bacterias que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae; característica común de las proteínas de choque térmico. (29,30,31) Además este resultado se asemeja al reportado por Bohemen y cols. (40) donde obtienen reacción cruzada entre enterobacterias hacia una proteína de aproximadamente 35 KDa de las membranas externas de estas bacterias. Con estos resultados no podemos descartar la posibilidad de que estas enterobacterias se encuentren relacionadas directamente al igual que K. pneumoniae en el proceso patológico de la E.A.; ya que estudios epidemiológicos han comprobado el aislamiento de estas bacterias en pacientes con E.A. (41).

Por otro lado un resultado más que apoya que p55Kp es una proteína de choque térmico, es que esta proteína se encuentra en citoplasma y membrana citoplasmática y no en membrana externa como lo muestran las figuras Nos. 9 y 10. Las HSPs se ha encontrado que realizan funciones fisiológicas citoplásmicas (40) y no como proteínas estructurales de las bacterias.

Por último tomando en cuenta los resultados de este trabajo y de otros autores, se presenta a continuación una hipótesis que puede

explicar la etiología de EA considerando lo siguiente:

- La p55Kp como una proteína de choque térmico
- El factor modificante liberado por algunas cepas de K. pneumoniae
- El antígeno HLA-B27 como un antígeno artrítico

Algunos autores reportan un factor proteico obtenido del sobrenadante de los cultivos de algunas cepas de K. pneumoniae que es capaz de modificar linfocitos T (B27 positivos) de personas sanas para hacerlos susceptibles al igual que los linfocitos T (B27 positivos) de pacientes con EA, a la lisis por complemento cuando es agregado un anticuerpo anti-K. pneumoniae. (30,39,40) La capacidad de liberar dicho factor por las bacterias se encuentra codificado por un plásmido. (41) Este factor modifica a los linfocitos T mediante un proceso metabólicamente activo, involucrando la síntesis de proteínas. (42) Esto nos lleva a pensar que este factor puede en algún momento inducir la síntesis de proteínas de choque térmico en las células del hospedero las cuales pueden estar asociadas genéticamente al antígeno HLA-B27 (30): Las proteínas de estas células por ser de choque térmico pueden compartir similitud antigénica con las proteínas de choque térmico de ciertos microorganismos infectantes dando como resultado el desencadenamiento de una respuesta autoinmune.

Aun falta mucho que demostrar para la comprobación de esta hipótesis por lo que se sugiere que para acercarse más a esta, se realicen estudios para buscar la p55Kp en células sinoviales de pacientes espondilíticos portadores del antígeno HLA-B27.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

-- La alta inmunogenicidad en ratones de la p55Kp, el cruce antigénico con la HSP de B. pertussis, la conservación de esta proteína en la familia Enterobacteriaceae y la localización en la bacteria en sitios característicos de las HSPs, hacen concluir que la p55Kp es una proteína de choque térmico.

-- Esta proteína puede ser agrupada en la familia de las HSP60 por presentar un peso molecular de aproximadamente de 55 kDa.

La p55Kp como proteína de choque térmico puede jugar un papel importante en el desencadenamiento de una inapropiada respuesta autoinmune contra proteínas que presentan similitud antigénica; como pueden ser proteínas de células de personas espondilíticas portadoras del antígeno HLA-B27.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Drozco J., Navarro Ana, Galván F. (1987). Espondilitis anquilosante. Prototipo de las espondiloartropatías seronegativas. Rev. Mex. Reumal Vol. 2 pag. 100-111.
- 2.- Muhammad Asim Khan, Skosey J. (1988) Ankylosing Spondylitis and Related spondyloarthropathies. Immunological Diseases, Vol. IV. Boston, Little. 1509-1511.
- 3.- Stites D. Fundenberg H. (1985) Inmunología Básica y Clínica. Edit. El manual moderno, S.A. México D.F. 5a. edición.
- 4.- Burgos Rubén. (1987) Espondilitis anquilosante: Evolución de conceptos. Rev. Mex. Reumal. Vol 2 No. 5, 97-99.
- 5.- A. Trull, A. Ebringer. G. Panayi. (1984) HLA-B27 and the immune response to enterobacterial antigens in ankylosing spondylitis. Clin. exp. Immunol.; 58, 74-80.
- 6.- P.E. Pease, H. Chahal, J. Tallack. (1988) Cross-reactivity studies on bacteria believed to be associated with inflammatory bowel disease (IBD), ankylosing spondylitis (AS) and reactive arthritis (ReA) British Journal of Rheumatology ; 27 (Suppl II); 32-33.
- 7.- Roitt Ivan, Brostoff Jonathan. Inmunología, Edit. Salvat Editores. 2a. edición.
- 8.- David T. Schaack Terry. (1989) Molecular Mimicry in HLA-B27-Related Arthritis. Annals of Internal Medicine.; 111:581-591.
- 9.- Maksymowych and Russell. (1991) HLA-B27 and Arthritis: Back to the Future. Part I. The Journal of Rheumatology; 18:2; 167-170.
- 10.- Ebringer Alan. (1991) Ankylosing Spondylitis and Klebsiella- The Debate Continues. The Journal of Rheumatology; 18:3; 312-313.
- 11.- Keat Andrew (1986). Is spondylitis caused by Klebsiella?. Immunol Today, 7: 144-149.
- 12.- Kretten Eric, Huber Olga (1991). No conclusive Evidence of an Epidemiological Relation Between Klebsiella and Ankylosing Spondylitis. The Journal of Rheumatology ; 18:3; 384-388.

- 13.- Alcantar Curiel Dolores (1990). Polisacarido de K. pneumoniae: virulencia y propiedades inmunogenicas. Trabajo Predoctoral. E.N.C.B. del I.P.N.: Marzo.
- 14.- Escobar Gutez. Garcia Latorre Ethel. Parra Victor. (1990) Reconocimiento de antigenos de K. pneumoniae en pacientes con Espondilitis Anquilosante juvenil y sus familiares v su relación con la presencia de HLA-B27. Premio Ciba. Geigy.
- 15.- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 16.- Towbin, H.; Staehelin. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4354.
- 17.- Minoru Ogasallara, Dwight H. Kono. (1986) Mimicry of human histocompatibility HLA-B27 antigen by K. pneumoniae. *Infection and Immunity*. Marzo. Vol. 51:3 p.901-908.
- 18.- Schnaitman, C.A. (1973). Outer membrana proteins of E. coli. I Effect of preparative conditions on the migration of protein in polyacrilamide gels. *Arch. Biochem.-Biophys.* 157:541-552.
- 19.- Parra C. Victor (1989). Klebsiella pneumoniae en la etiología de la espondilitis anquilosante. Tesis de licenciatura. FES-C; UNAM. Mexico.
- 20.- Schwimmbeck, M.D. (1988) Micheel. Molecular Mimicry between Human Leukocyte Antigen B27 and Klebsiella. *The American Journal of Medicine*; Vol.85 (suppl 6A). 51-53.
- 21.- Gunnar Husby, Naotuki Tsuchiva, Schwimmbeck Peter. (1989). Cross-Reactive Epitope with K. pneumoniae Nitrogenase in Articular Tissue of HLA-B27+ Patients with Ankylosing Spondylitis. *Arthritis and Rheumatism*, Vol. 32, No.4 April.
- 22.- N. Tsuchiva, G. Husby and R.C. Williams. (1989) Studies of humoral and cell-mediated immunity to peptides shared by HLA-B27.1 and K.pneumoniae. nitrogenase in ankylosing spondylitis. *Clin. Exp. Immunol.* 76, 354-360.
- 23.- Baron Murray and Zendei Ivan. (1989). HLA-B27 Testing in Ankylosing Spondylitis: An Analysis of the Pretesting Assumptions. *The Journal of Rheumatology*; 16:5; 631-636.

- 24.- Schlosstein Lee, M.D., Terasaki Paul. (1973) High Association of an HLA-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. The new England Journal of medicine; Vol. 288 No.14; 704-706.
- 25.- Ross E. Petty. (1990), HLA-B27 and Rheumatic Diseases of Childhood; Journal of Rheumatology; (suppl 26) 17; 7-10.
- 26.- Corrigan Valerie, G.S. Panayi. (1978). Detection of immune complexes in serum of patients with ankylosing spondylitis. Journal of the Rheumatic Diseases; Vol. 37, 159-163.
- 27.- A. Warmold L. and Wall Bake. (1988) Immunoglobulin Synthesis by Peripheral Blood Lymphocytes in Patients with Ankylosing Spondylitis. The Journal of Rheumatology; 15:9; 1410-1414.
- 28.- Drusilla L. Burns, Jeanine L and Kessel Martin. (1991). Purification and Immunological Characterization of a GroEL-Like Protein from Bordetella pertussis. Infection and Immunity; Apr. Vol. 59. No.4, p. 1417-1422.
- 29.- S. Polla Barbara and Young Douglas. (1989). Heat shock proteins and immunity. Immunology Today, Vol. 10 No. 12, p. 393-394.
- 30.- A. Young Richard and Elliott Timothy. (1989). Stress Proteins, Infection, and Immune Surveillance. Cell. Vol 59, October 6. 5-8.
- 31.- Kaufmann Stefan. (1990). Heat Shock proteins and the immune response. Immunology Today, Vol. 11 No.4, p 129-136.
- 32.- Young A. Richard. (1990). Stress proteins and Immunology. Anna. Rev. Immunol; Vol. 8:401-420.
- 33.- Shanafelt Marie, Hinderesson Peter, Soderberg Carol. (1991). T cell and antibody reactivity with the Borrelia burgdorferi 60-KDa heat shock protein in Lyme arthritis. The Journal of Immunology; Vol 146 No. 11, June. p. 3985-3992.
- 34.- Hogervorst M., Boog J. P. Claire, Wagenaar P. A. Josee. (1991). T cell reactivity to an epitope of the mycobacterial 65-KDa heat-shock protein (hsp65) corresponds with arthritis susceptibility in rats and is regulated by hsp 65-specific cellular responses. Eur. J. Immunol. Vol 21: 1289-1296.
- 35.- Res. C. M. Pieter, Orsini L. M. Daniela, Van Laar Jacob. (1991) Diversity in antigen recognition by Mycobacterium tuberculosis reactive T cell clones from the synovial fluid of rheumatoid arthritis

- patients. Eur. J. Immunol. Vol. 21: 1297-1302.
- 36.- Raybourne Richard, Bunning Kelly and Williams A. Kristina. (1988). Reactive of anti-HLA-B monoclonal antibodies with envelopment protein of Shigella species. The Journal of Immunology. Vol. 140, No. 10 Mayo 15. p 3489-4395.
- 37.- Wakefield Denis, Stanberg H. Tom and Tennant Carolyn. (1990). Serologic Evidence of Yersinia Infection in Patients With Anterior Uveitis. Arch. Ophthalmol. Vol. 108, February. 219-221.
- 38.- Geczy A. F., Kerri Alexander and Helen V. Bashir. (1980). A factor in Klebsiella culture filtrates specifically modifies an HLA-B27 associated cell-surface component. Nature Vol 283, February 21: 782-784.
- 39.- Trapani Joseon and McKenzie Ian. (1985). Klebsiella modifying factor: binding studies with HLA-B27+ and B27- lymphocytes. Annals of the Rheumatic Diseases. Vol. 44: 169-175.
- 40.- P. Orban, J. S. Sullivan, A.F. Geczy. (1983). A factor shed by lymphoblastoid cell lines of HLA-B27 positive patients with ankylosing spondylitis, specifically modifies the cells of HLA-B27 positive normal individuals. Clin, exp. Immunol. Vol. 53: 10-16.
- 41.- Cameron H. Fiona, Russell J. Pamela, Sullivan John. (1983) Is a -- Klebsiella plasmid involved in the aetiology of ankylosing spondylitis in HLA-B27-positive individual? Molecular Immunology. Vol. 20. No. 5. pp 563-566.
- 42.- Sullivan J. S. and A. F. Geczy. (1985). The modification of HLA-B27 positive lymphocytes by the culture filtrate of Klebsiella K43 BTS. 1 is a metabolically active process. Clin. Exp. Immunol. Vol. 62, p 672-677.
- 43.- Bohemen, E. Weterings, H. S. Goethe. (1988). Enterobacterial involvement in the pathogenesis of secondary ankylosing spondylitis British Journal of Rheumatology; Vol. 27 (suppl II): 61-67.