

38
2ej.



Universidad Nacional Autónoma
de México



Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLÁN

**ESPONDILITIS ANQUILOSANTE, HLA-B27
Y FACTORES AMBIENTALES**

**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

Martín de Jesús Penagos Córdova

Directoras: Dra. 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.

I N D I C E

	PAGINA
DEDICATORIAS.....	
RESUMEN.....	5
INTRODUCCION.....	7
CAPITULO I ESPONDILITIS ANQUILOSANTE.....	9
CAPITULO II ESPONDILITIS ANQUILOSANTE Y HLA -B27.....	14
CAPITULO III ESPONDILITIS ANQUILOSANTE Y FACTORES AMBIENTALES.....	19
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y METODOS.....	27
RESULTADOS.....	41
DISCUSION.....	63
CONCLUSION.....	67
APENDICE.....	68
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	69
ABREVIATURAS.....	70
BIBLIOGRAFIA.....	71

RESUMEN

La espondilitis anquilosante (EA) es una enfermedad inflamatoria crónica, que afecta la región sacrolumbar causando desde fibrosis hasta anquilosis de las vértebras. La etiología de la EA es desconocida, pero se ha demostrado muy claramente que existe una fuerte asociación entre la enfermedad y la presencia del marcador genético HLA-B27. Sin embargo, ésta asociación no explica la existencia de pacientes con EA y que no son B27 y que no todos los B27 padecen de EA. Debido a ésto se ha sugerido que existen factores ambientales que pudieran junto con el marcador genético, ser responsables de la etiología de la enfermedad. Entre estos factores se han mencionado a infecciones entéricas por bacterias gram negativas, de los géneros Klebsiella, Yersinia, Shigella. Se ha mencionado que existe mimetismo molecular bien descrito entre la nitrogenasa de Klebsiella pneumoniae y la molécula B27.

En un trabajo previo se encontro un reconocimiento diferencial para una proteína de 55 KDa definida como p55, por pacientes HLA-B27+ en el presente trabajo se corroboró si esta diferenciación se da en un grupo mayor de pacientes y se no estaba en relación con el cuadro clínico; se caracterizó a la p55 creciendo a las bacterias en diferentes medios de cultivo E-, E+ y caldo soya tripticaseína, por los resultados obtenidos se excluye la posibilidad de que p55 se encuentra relacionada con los mecanismos de fijación de nitrógeno.

Se determinó que p55 se expresaba en otros géneros enterobacterianos bajo las mismas condiciones de cultivo trabajadas previamente. Se realizó un análisis para la respuesta de anticuerpos de pacientes frente a patrones electroforéticos de cepas aisladas en sus propias heces; también se detectó en un considerable porcentaje 60% la presencia de p55, y el anticuerpo que la reconoce es de clase IgG lo que implica respuesta secundaria y sistémica, la cual involucra a las células T.

El análisis se hizo mediante la técnica de IET utilizando como antígenos extractos totales de bacterias.

Se concluye que la p55 de alguna manera se relaciona con la presencia del HLA-B27, no está en relación con el cuadro

clínico, la p55 no se encuentra relacionada con la nitrogenasa, se expresa en otros géneros enterobacterianos y el anticuerpo que la reconoce es de clase IgG lo que implica respuesta secundaria por estímulo sistémico.

INTRODUCCION

La Espondilitis anquilosante (EA), es una enfermedad inflamatoria crónica, de etiología desconocida, que afecta a las articulaciones, entesis axiales y periféricas, originando osteítis e invasión de cartilagos causando metaplasia y osificación; forma parte de las espondiloartropatías seronegativas (1-6); las cuales incluyen diversas enfermedades artríticas que tienen en común la ausencia del factor reumatoide (1,2-4), las características generales de estas enfermedades son:

frecuentes:

- Sacroiliitis con o sin espondilitis.
- Inflamación articular periférica.
- Ausencia de anticuerpos anti-nucleares.
- Ausencia de nódulos reumatoides.
- Tendencia a la agregación familiar.

Menos frecuente:

- Inflamación ocular como iritis aguda o conjuntivitis.
- Anormalidades cardíacas como aortitis.

Las Espondiliartropatías seronegativas importantes son:

- Espondilitis anquilosante EA (mayor importancia clínica).
- Artropatía psoriática.
- Síndrome de Reiter o Artritis reactiva.
- Artropatía juvenil crónica.
- Colitis ulcerativa crónica.
- Enfermedad de Whipple.
- Enfermedad de Crohn.
- Uveítis anterior aguda.
- Enfermedad de Behcet.

Se reconoce que la EA es una entidad que se expresa clínicamente en varias formas, dependiendo de ciertos factores entre los que se encuentran:

Grupo étnico: La población mestiza mexicana con EA posee ciertas particularidades entre las que se encuentran un alto porcentaje de enfermos menores de 16 años, con inicio de la sintomatología, así como una notable afectación de las articulaciones periféricas que la hacen diferente a la observada en otros grupos raciales (3,8,9). Por lo que la EA se ha clasificado en juvenil y del adulto de acuerdo con la aparición inicial de síntomas, antes o después de 16 años (6,10). La EA juvenil no difiere de la del adulto en casos avanzados, pero al inicio tiene diferencias significativas en cuanto a su expresión, gravedad, asociación con fenotipos de glioxilasa, etc (7,8).

Presencia o ausencia de HLA B-27: Se ha establecido una predisposición genética asociada a este antígeno, por lo que se implica a este en la patogénesis de la enfermedad, sin haber determinado de manera precisa la etiología de esta (1,11,12).

Factores ambientales: Dentro de estos se encuentran las infecciones por microorganismos gram negativos (enterobacterias) de los géneros Klebsiella, Shigella, Yersinia y Salmonella (3); los cuales de alguna manera favorecen la respuesta anormal, dando como resultado la enfermedad (1-4). Influye también el sexo, pues la enfermedad se presenta con mayor frecuencia en hombres que en mujeres, en relación de 9:1 aproximadamente (4).

ESPONDILITIS ANQUILOSANTE

El término Espondilitis Anquilosante (EA), deriva del griego spondylos que significa vértebra y ankylos cuyo significado es soldar o fundir, es decir vértebras fusionadas. La fibrosis, así como la anquilosis, son consecuencia del proceso inflamatorio crónico, aunque la anquilosis de la columna aparece sólo en estadios muy avanzados de la enfermedad (13).

La EA, desde su origen ha sido descrita y conocida mediante los siguientes sinónimos:

- Espondilitis anquilopoyética
- Espondiloartritis anquilopoyética
- Espondilitis adolescente
- Espondilitis atrófica ligamentosa
- Espondilitis deformante
- Espondilitis reumatóide
- Espondilitis rizomiéltica
- Enfermedad de Marie-Strumpell
- Enfermedad de Von Bechterew (13)

HISTORIA

Existen descripciones de la (EA) en momias egipcias las cuales se remontan hasta 3000 años A.C., en ellas se encuentran desórdenes óseos como vértebras fusionadas desde la columna cervical hasta el cóccix (13).

Se considera como primer reporte, el realizado por Bernard Connor en 1695, el cual describe parte de un esqueleto con fusión completa de los cuerpos vertebrales, costillas, ilión y sacro formando una sola pieza (13).

En el siglo XIX, Bechterew hizo una serie de publicaciones con la descripción de la enfermedad a la que determinó "inflamación anquilosante de la columna y grandes articulaciones de los miembros inferiores". En la década de los 50 de este siglo, se enfatiza acerca de la tendencia a la agregación familiar de la enfermedad y de ahí se empieza a creer en la susceptibilidad heredada. Esta sospecha fué confirmada hasta 1973 por Scholostein (14), el cual asoció a

la EA con el complejo principal de histocompatibilidad HLA-B27 (5).

DIAGNOSTICO

Los criterios más importantes para el diagnóstico de la EA son los aprobados en Nueva York en 1966, en los cuales se define que se puede establecer un diagnóstico definitivo si hay sacroiliitis bilateral acompañada de al menos uno de los siguientes criterios, o si la sacroiliitis es unilateral forzosamente con el primer criterio y cualquiera de los otros dos (4,15):

- 1) Limitación de la movilidad de la columna lumbar en los tres planos: flexión anterior, flexión lateral y extensión.
- 2) Historia o presencia de dolor en la unión dorsolumbar.
- 3) Limitación de la expansión torácica de 2.5 cm. o menos, medida a la altura del cuarto espacio intercostal.

Con el hallazgo de que el HLA-B27 tiene asociación con la EA de entre el 60-80% en la población mexicana (12,16), puede considerarse, más que un criterio para el diagnóstico, como una prueba indicativa de susceptibilidad, principalmente en casos de sacroiliitis asintomática.

Sin embargo el método más útil y barato para el diagnóstico sigue siendo la radiografía de la pelvis (15).

PATOLOGIA

Las alteraciones patológicas ocurren en las articulaciones diartrodiales con sinovitis crónica. Existe hiperplasia del tejido sinovial con proliferación de sinoviocitos, infiltración de linfocitos, células plasmáticas e histiocitos (5).

Estas relaciones son muy características en la artritis reumatoide, por lo que la EA se consideró por mucho tiempo como variante de ésta. Sin embargo, la diferencia es que en la EA existe una tendencia a la afectación de articulaciones fibrocartilaginosas como los discos intervertebrales, la articulación del manubrio esternal, la sínfisis del pubis y los ligamentos intervertebrales (4).

Las articulaciones sacroilíacas están involucradas en el 100% de los pacientes, donde existe destrucción del cartilago, erosión y esclerosis del hueso yuxta-articular, fibrosis y finalmente anquilosis ósea (4).

Existen también lesiones inflamatorias focales de la cápsula articular y en las entésis. Estas lesiones inicialmente inflamatorias o entesopáticas evolucionan a fibrosis reactiva y posteriormente son reemplazadas por hueso (espolones calcáneos y sindesmoftos) (4)

Además de las lesiones en las articulaciones e inserciones tendinosas, la enfermedad puede afectar el corazón, el tracto uveal (uveítis), el lobulo superior de los pulmones, la aorta con destrucción de la capa media a nivel del anillo, porción superior y origen de las arterias carótidas. Ocasionalmente también está involucrada la aorta descendente. La aortitis evoluciona a engrosamiento de la capa íntima y obliteración de las arterias de mediano calibre debido a un aumento en el músculo liso. Teniendo como consecuencia a la insuficiencia aórtica y en etapas avanzadas la calcificación de sus paredes (4).

CUADRO CLINICO

La EA en general debe sospecharse en cualquier paciente, principalmente joven, con dolor por debajo de la espalda en quien se ha descartado patología como lumbalgia de tipo postural o mecánica, hernia del disco intervertebral, la osteoartritis o malformaciones congénitas (4,10).

Los síntomas con frecuencia se exacerban en la mañana al levantarse o después de periodos prolongados de inactividad y tiende a mejorar al cambiar de posición o con el ejercicio (10).

El grado de severidad de las manifestaciones iniciales puede variar desde una pequeña molestia de pocos minutos de

duración por las mañanas hasta un espasmo lumbar severo con incapacidad para la movilización inmediata al levantarse (4,10).

A medida que la enfermedad progresa, ocurre fusión entre los cuerpos vertebrales. El dolor de la región sacroiliaca suele ser insidioso, difícil de localizar pero referido a la zona glútea y a veces en la cresta iliaca cercana a la región del gran trocánter y al dorso del muslo. El dolor puede exacerbar al toser o estornudar. La rigidez matinal de la columna o "sensación de cansancio", puede durar hasta dos horas y desaparecer con un baño caliente, ejercicio o marcha (4,10).

Las articulaciones periféricas más afectadas son los hombros y las caderas hasta en un 35% durante el curso de la enfermedad y también puede ser síntoma inicial en algunos pacientes. La afección de los coxofemorales es generalmente bilateral e insidiosa al inicio, pero potencialmente incapacitante más que cualquier otra articulación ya que puede llegar a la fusión completa, en estadios avanzados, la imposibilidad para la flexión de rodillas dando lugar a la marcha característica con la cabeza flexionada hacia adelante en posición rígida (4,10).

La participación de articulaciones periféricas (sin considerar los hombros ni las caderas) es del 15 al 25% y puede ser también, de forma unilateral, manifestación inicial en la rodilla y el tobillo con formación importante de líquido intraarticular. La articulación temporomaxilar se puede afectar en el 10% de los pacientes con gran dolor al masticar (4).

La afección exoesquelética más común en pacientes con EA es la uveítis llamada también iridociclitis aguda y ocurre en el 25% de los pacientes en algún momento del curso de la enfermedad (5,17). La inflamación es de tipo no granulomatoso, de inicio agudo y generalmente unilateral. Los síntomas incluyen dolor, lagrimeo y fotofobia. A veces preceden a las manifestaciones esqueléticas.

La fibrosis pulmonar apical se presenta en pacientes con EA de larga evolución (20 años promedio). Generalmente es bilateral y aparece radiológicamente como lineares o en placas (18).

PREVALENCIA

La enfermedad es más frecuente de lo que se piensa y muchos de los pacientes en principio considerados con lumbalgias mecánicas, son posteriormente diagnosticados como espondilíticos. Mientras que la prevalencia de EA en caucásicos se encuentra 0.5 y 2.3 por 1000, en no caucásicos puede ir de 0.7 a 93 por 1000. Lo cual se encuentra en relación a la presencia o no del HLA-B27 en las poblaciones (14). Así, en la población mexicana la frecuencia de este marcador es muy alta (5.5%) donde alrededor del 68.62% de los pacientes lo presentan (14,16,19).

La expresión clínica de la enfermedad difiere también entre grupos étnicos, razas y sexo. Por ejemplo algunas observaciones muestran que en la población mestiza mexicana, aproximadamente el 50% muestran la forma juvenil de la enfermedad y además en la gran mayoría de ellos la enfermedad se presenta antes de los 16 años (16,19). Por otro lado, en algunos estudios se ha mostrado una relación mayor en hombres que en mujeres, de 9:1 respectivamente (4).

En la población mexicana como ya se mencionó la enfermedad se desarrolla alrededor de los 20 años de edad. En individuos, principalmente los que carecen de el marcador B27, la enfermedad aparece en décadas tardías, como en los casos de la artritis psoriática (20).

ETIOLOGIA

La etiología precisa de la enfermedad no se conoce aún, aunque se encuentra establecida la predisposición genética asociada al HLA-B27 (12,14,15). Por lo que se menciona que el marcador B27 juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, favoreciendo de alguna manera una respuesta inmunológica anormal mediante la presencia de factores ambientales como "infecciones por bacterias gram negativas" (3).

ESPONDILITIS ANQUILOSANTE Y HLA-B27

El HLA-B27, es un antígeno del complejo principal de histocompatibilidad de clase I, esta compuesta de una cadena transmembranal de 44 KDa asociada en forma no covalente con la invariable beta 2-microglobulina de 12 KDa (20).

El conocimiento molecular de los genes HLA clase I, ha progresado; recientemente el gene B27 ha sido clonado en varios laboratorios, por consiguiente se conoce de manera detallada la estructura del B27, la cual esta compuesta de 3 dominios extracelulares denominados (X1, X2, X3). Los dominios NH2 terminales (X1, X2) son los encargados de llevar las determinantes polimórficas de esta molécula, el dominio X3 es idéntico para B7 y B27 (20)

Las estructuras primarias de los antígenos HLA- B27 han sido ya definidas. Por lo menos existen 6 variantes, sin embargo, la predisposición a la enfermedad no parece limitarse a una variante en particular (27)

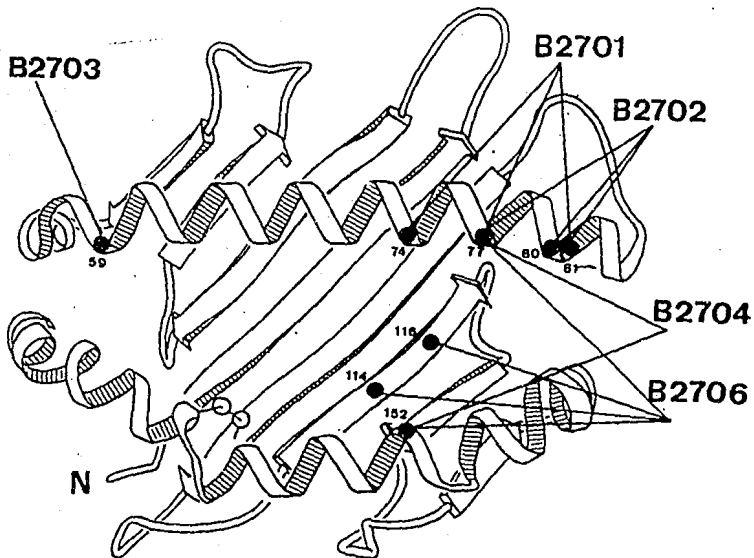


Fig I ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL HLA-B27.
 Localización espacial de diferentes aminoácidos que constituyen los subtipos del HLA-B27. Basada en la estructura tridimensional del HLA-A2.

Con el tiempo han surgido variantes genéticas, en poblaciones de distintas razas, la frecuencia del HLA-B27 y sus formas alélicas varían considerablemente entre éstas tabla 1 (21).

La asociación entre la EA y el HLA-B27 es vista ampliamente, sin embargo no pasa de ser un señalador omnipresente de la enfermedad (21).

TABLA 1 DISTRIBUCION RACIAL DE ALELOS HLA-B27.

ALELOS HLA-B27	DISTRIBUCION
B27 01	"Se encontró en 2 familias blancas"
B27 02	10 al 15% de personas B27+ Segundo más común.
B27 03	"Se encontró en un negro americano"
B27 04	Subtipo más común en personas orientales
B27 05	Se encuentra en todos los grupos étnicos
B27 06	Subtipo más común en personas orientales

Como puede observarse el B27 05 es el prototipo de B27 y fué el que probablemente no a cambiado despues de la separación de razas blanca y oriental (21).

Cuando se descubrió la fuerte asociación entre EA y HLA-B27, se pensó que la etiopatogénesis ya podía ser entendida. Sin embargo hay algunos aspectos que no pueden ser explicados por ésta simple asociación:

- 1) No todos los individuos con B27 desarrollan EA.
- 2) La presencia de B27 en forma homocigota no es suficiente para causar la enfermedad.
- 3) No todos los enfermos de EA son B27 (23,24).

Por lo anterior se postularon dos teorías para explicar la relación existente:

Teoría de los genes

Expuesta por Mc. Devitt en el año de 1974 (22), sugiere que la presencia de dos genes, localizados en el brazo corto del cromosoma 6 humano, el primero codifica para el HLA-B27 y el otro para la EA (gene AS). Se cree que los individuos con los genes AS y B27 desarrollarán la enfermedad, mientras que los individuos B27 los cuales no lleven el gene AS, no desarrollarán la enfermedad. Indica además que ambos genes se encuentran en desequilibrio de enlace. No puede explicar esta teoría como es que el gene AS es el causante de la enfermedad (22).

Teoría de un gen o Reacción cruzada

La apoyan varios estudios y menciona la presencia del gen que codifica para el HLA-B27, localizado en el brazo corto del cromosoma 6 humano. Se basa en la presencia de antígenos extraños de microorganismos gram negativos los cuales semejan a este, provocando reacción cruzada (23,24).

ESPONDILITIS ANQUILOSANTE Y FACTORES AMBIENTALES

La relación existente entre la EA y Microorganismos, surge como consecuencia de la relación entre la EA, y el HLA-B27 y enteritis causada por microorganismos como Klebsiella, Yersinia, Shigella y Salmonella. Con la consecuente aparición de artritis reactiva, uretitis anterior, enfermedad inflamatoria del intestino (25-30).

En el primer congreso de HLA y enfermedad en el año de 1976, el grupo de Ebringer fué el primero en proponer una asociación entre Klebsiella y EA (33,34). Otro grupo encabezado por Geczy, sugiere un posible papel de Klebsiella en el desencadenamiento de la enfermedad, pero involucran al microorganismo de manera diferente, surgiendo de esta manera dos hipótesis:

1) Hipótesis del receptor (GECZY (57,58)).

Este grupo propone la existencia de un marcador de superficie o receptor para la espondilitis, ya sea que se trate del propio B27 o que se encuentre asociado a él. Con esta base Arnason y Thorsteinsson (56) postulan que el determinante de la reacción cruzada en la célula pudiera ser parte de la molécula B27 modificada por la adición de algún componente bacteriano y que esto pudiera permitir la iniciación de una reacción inmune restringida genéticamente, la cual pudiera dañar el tejido del paciente (56)

Estas observaciones fueron muy apoyadas por el grupo de Geczy, los cuales pudieron demostrar que fue posible modificar la apariencia genética de células B27+ de un individuo no espondilítico por medio de la incubación con el sobrenadante de un cultivo de Klebsiella. Después de dicha incubación las células tuvieron un comportamiento parecido a la de los espondilíticos B27+ y fueron igualmente lisados por el suero anti-Klebsiella. Por lo tanto se dice que el medio de cultivo contiene un factor o factores modificantes y sólo aquellas células que portan el antígeno B27 pueden ser modificadas por este, sugiriendo de esta manera que la molécula B27 por sí misma actúa como receptor de ese factor (57,58).

Posteriores estudios acerca de ese factor modificante producido por Klebsiella indican que se origina de la membrana externa de la bacteria y que tiene un peso molecular entre 26 y 30kDa (59), es termolábil a 56° C por 30', es sensible al tratamiento con neuraminidasa y estable con tripsina y quimotripsina. La síntesis y excreción del factor modificante es un evento que ocurre sólo en el 8% de los aislamientos (58).

Las células de sujetos normales B27+ que son susceptibles a la lisis por el suero anti-klebsiella después de la exposición al factor modificante, rápidamente pierden su susceptibilidad a la molécula (ó moléculas) la cual temporalmente se adhiere a la superficie, de la cual poco después se desprende. No existe un biotipo de Klebsiella que produzca este factor, aparentemente es un evento al azar (60). Sin embargo se ha demostrado que removiendo un plásmido de Klebsiella el microorganismo es incapaz de sintetizar el factor, mientras que transfiriendo el plásmido a Escherichia coli, ésta lo elabora (61). La hipótesis fué descartada pues no fué reproducible en varios laboratorios.

2) Hipótesis de reacción cruzada (EBRINGER (17,27,34))

Propone la generación de una respuesta de anticuerpos contra antígenos de Klebsiella, la cual es cualitativa y cuantitativamente inadecuada para la eliminación del microorganismo. La persistencia de infecciones recurrentes de este género, implica la producción continua de anticuerpos, los cuales reconocen por reacción cruzada el tejido del paciente, como consecuencia a esta se dispara la cascada de complemento dando como resultado el daño tisular (17,23,34).

Se ha demostrado que existe mimetismo molecular entre el microorganismo y el HLA-B27, en estudios realizados por computadora, se ha identificado similitud en secuencia de aminoácidos entre la molécula B27 y el componente II de la nitrogenasa de Klebsiella pneumoniae; en el HLA-B27 (residuos de aminoácidos 72-77) y la enzima nitrogenasa de la enterobacteria (residuos de aminoácidos 188-193). Estas secuencias en ambos son hidrofílicas; lo que sugiere se encuentren expuestas en la superficie celular (35,36).

La enzima nitrogenasa se encuentra involucrada en la reducción biológica del nitrógeno atmosférico (N₂) dando como producto amonio (NH₄⁺) (35,36).

La nitrogenasa esta constituida por un complejo de dos proteínas denominadas:

- Componente I (Proteína-MoFe ó nitrogenasa)
- Componente II (Proteína-Fe ó nitrogenasa reductasa)

Componente I: Tiene un peso molecular de 200- 250 kDa y contiene dos átomos de molibdeno Mo, 28-34 átomos de fierro Fe y de 26 a 28 puentes disulfuro (ácidos lábiles). Es un tetramero formado por dos monómeros alfa y dos beta, con 60 kDa cad uno. Dos genes codifican la estructura de éste componente: Gene nif K y el gene nif D.

Componente II: Tiene un peso molecular de 55 a 65 kDa y contiene 4 átomos de fierro Fe, 4 puentes disulfuro (ácidos lábiles). Es un dímero cada un con 30 kDa; el gene que lo codifica es el nif H (genes mencionados para Klebsiella pneumoniae).

La actividad enzimática se puede determinar por medio de cromatografía de gases (38,40).

Es importante señalar que las nitrogenasas de las diferentes bacterias fijadoras de nitrógeno, tienen propiedades similares y propiedades variables entre si (37).

Se ha observado también que existe un aumento en la concentración de IgA circulante dirigida contra Klebsiella, en los pacientes con EA definida. Por ello se considera a ésta como uno de los factores ambientales involucrados en la etiología de la enfermedad. Pero la evidencia es bastante controvertida (33,41-44).

Así, en el grupo de las espondiloartropatías seronegativas, se propone una tendencia o reacción cruzada entre el HLA-B27 y las bacterias gram negativas; se han identificado algunos posibles componentes de estas, los cuales de alguna manera cruzan con el HLA-B27 (25-30).

Inicialmente los estudios se limitaron a Klebsiella pneumoniae pero actualmente se encuentra bien establecido que se involucran una serie de componentes de diversas enterobacterias en el fenómeno de reacción cruzada (25-30).

Las proteínas de la membrana externa de las enterobacterias son antígenos multifuncionales, constituyen aproximadamente la mitad de todas las proteínas de la envoltura celular. Se ha encontrado una proteína de 35kDa denominada (h-momp) con reactividad cruzada en muchas enterobacterias, la cual es modificable al calor, se han detectado anticuerpos IgA dirigidos contra ésta proteína en pacientes con EA (45).

La uveítis anterior y el síndrome de Reiter son espondiloartropatías de etiología conocida, se relacionan también como en la EA con la presencia del HLA-B27 el cual se encuentra ligado a enfermedades reumáticas (28,46-48). Ambas enfermedades frecuentemente siguen a una infección por bacterias gram negativas como Yersinia, pues se han detectado antígenos de este género en fluido articular sugiriendo a la enterobacteria como un desencadenante de la enfermedad (49).

Se han detectado anticuerpos de reacción cruzada hacia las proteínas de diferentes enterobacterias y el B27, en 2 de 63 pacientes con algún tipo de espondiloartropatía recientemente infectado por Shigella flexneri, Campilobacter jejuni, Yersinia enterocolitica (28).

Los leucocitos PMN de pacientes hombres con EA responden de manera elevada a estímulos quimiotácticos proporcionados por antígenos de Yersinia pudiendo ser los responsables de la excesiva respuesta inflamatoria (50).

Ha sido detectada también asociación de carga fecal de Klebsiella pneumoniae y Yersinia enterocolitica en pacientes con EA y Uveítis anterior; no relacionando a Salmonella, Shigella o Campilobacter en ella (27).

Pacientes con EA presentan la enfermedad inflamatoria del intestino cuando se encuentran infectados por Yersinia (51,52).

Los microorganismos que han sido involucrados con el Síndrome de Reiter son Shigella flexneri, Salmonella thiphimurium, Campilobacter jejuni, Clostridium y clamidia, ocasionalmente a Borrelia burgdorferi y con mayor frecuencia Yersinia enterocolitica (21).

Se ha detectado una proteína de 40 kDa en diferentes enterobacterias pero con un reconocimiento mas marcado para Shigella sonnei (53).

El proceso de mimetismo molecular se restringe a un número pequeño de antígenos específicos más que a un desorden generalizado y sólo se estudian los antígenos que de alguna manera se relacionan con la presencia del HLA-B27 (54).

Un rasgo muy importante para la expresión de péptidos es la dependencia de estos para su expresión bajo las condiciones de cultivo bacteriano. Se simulan diferentes condiciones para observar la gama de péptidos expresados determinando de esta manera, cuales son reconocidos de manera predilecta por pacientes EA con HLA-B27 además de crear respuestas inmunológicas prolongadas (55).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el laboratorio de inmunquímica del Departamento de Inmunología en la ENCB, se ha analizado la relación existente entre EA y Klebsiella pneumoniae.

En un trabajo previo se analizaron sueros de individuos con EA HLA-B27+ (9), HLA-B27- (1), enfermedad espondilítica EE HLA-B27+ (6), HLA-B27- (3), aparentemente sanos HLA-B27+ (8) y HLA-B27- (10). Se encontró un reconocimiento intenso a una proteína de 50-60 kDa, (p 55) en los individuos B27+ independientemente de su estado clínico. Dado que el monómero del componente I de la nitrogenasa de Klebsiella pneumoniae posee ese peso molecular, se pensó en una posible relación para con éste, además del mimetismo ya descrito para el componente II (35-36).

3) HIPOTESIS DE TRABAJO

Por ello en el presente trabajo nos proponemos realizar un estudio con un mayor número de sueros para corroborar con una mayor significancia el reconocimiento preferencial hacia la proteína de 50-60 kDa (p55) por los sujetos B27+. Por otra parte determinaremos el isotipo del anticuerpo involucrado en este reconocimiento; comprobaremos si la proteína reconocida está relacionada con la nitrogenasa y si el reconocimiento es único para este género enterobacteriano.

OBJETIVOS

- Corroborar la respuesta diferencial de anticuerpos al antígeno p55 de Klebsiella pneumoniae por individuos B27+ y B27-.
- Demostrar que p55 de Klebsiella pneumoniae no esta relacionada con la nitrogenasa.
- Demostrar la producción de p55 de Klebsiella pneumoniae en diferentes medios de cultivo.
- Demostrar la presencia de p 55 de Klebsiella pneumoniae en otros géneros enterobacterianos.
- Analizar el reconocimiento por anticuerpos de los sueros de pacientes con EA y HLA-B27+, contra cepas de enterobacterias aisladas de sus propias heces.
- Determinar el isotipo del anticuerpo el cual reconoce a la p55 caracterizada.

MATERIALES Y METODOS

A.- MATERIAL QUIMICO Y EQUIPO

1.- Medios de cultivo

A).- Medio E con iones amonio (NH⁺) como fuente de nitrógeno (E+):

MgSO₄ 0.2 g

Acido citrico 2.0 g

NH₄ NaHPO₄ .4H₂O 3.5 g

K₂ HPO₄ 10.0 g

FeCl₃ .6H₂O 0.1 g

Glucosa 20.0 g

Agua destilada hasta 1 litro

B).- Medio E modificado, sin fuente de nitrógeno (E-):

MgSO₄ 0.2 g

Acido citrico 2.0 g

K₂ HPO₄ 10.0 g

NaH₂PO₄ .H₂O 2.31 g

NaMoO₄ .2H₂O 0.02 g

FeCl₃ .6H₂O 0.1 g

Glucosa 20.0 g

Agua destilada hasta 1 litro.

Los reactivos para ambos medios de cultivo proceden de Merck Naucalpan, Edo. de México.

2.- Determinación de actividad de nitrogenasa.

- Medio E⁺ y E⁻, semisólido con agarosa al 0.6%
- Etileno (INFRA, Naucalpan, Edo. de México).
- Acetileno: Obtenido en el laboratorio por reacción entre carburo de calcio y agua.
- Cromatografo de gases PYE-UNICAMP, con columna de vidrio empaque de poropack 80-100 mesh, detector de hidrógeno-aire, ionización de flama y graficador.

3.- Reactivos y equipo para desarrollar la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE). Todos los reactivos son procedentes de Sigma Co. Sn. Louis MD. USA., los solventes de Baker, S.A. Xalostoc, Edo. de México. los reactivos Preparados se filtran en papel Whatman # 1 guardandose a 4°C.

A).- Solución de monómeros acrilamida-bisacrilamida (30.8% T).
Acrilamida 30.0 g
Bis-acrilamida 0.8 g
Agua bidestilada hasta 100 ml.

B).- Regulador de gel separador (Tris-HCl 1.5 M pH 8.8)
Trizma base 18.15 g
Agua bidestilada 90.0 ml
Se ajusta el pH 8.8 con HCl 6 N
Se afora con agua bidestilada a 100 ml

- C).- Regulador de gel concentrador (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8).
- | | |
|--|---------|
| Trizma base | 3.0 g |
| Agua bidestilada | 90.0 ml |
| Se ajusta el pH 6.8 con HCl 6 N | |
| Se afora con agua bidestilada a 100 ml | |
- D).- Lauril sulfato de sodio (SDS) al 10%
- | | |
|--------------------------------|--------|
| SDS | 10.0 g |
| Agua bidestilada hasta 100 ml. | |
- E).- Persulfato de amonio al 10%
- | | |
|----------------------|--------|
| Persulfato de amonio | 20 mg |
| Agua bidestilada | 200 ML |
- F).- TEMED (N',N',N',N',-metiletilendiamina), Sigma,Co
- G).- Regulador de corrimiento (Tris 0.025 M-Glicina 0.192 M SDS al 0.1%, pH 8.3).
- | | |
|--|---------|
| Trizma base | 3.0 g |
| Glicina | 14.4 g |
| SDS al 10 % | 10.0 ml |
| Agua bidestilada hasta 1 litro (no se ajusta pH) | |
- H).- Regulador de muestra 2X
- | | |
|--|--------|
| Tris 0.5 M 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 algunos cristales de azul de bromofenol como indicador. | |
- I).- Solución madre azul Coomassie para tinción de geles
- | | |
|---------------------|----------|
| Azul Coomassie R250 | 2.0 g |
| Agua bidestilada | 200.0 ml |
- J).- Colorante de trabajo para tinción de proteínas
- | | |
|--------------------------|----------|
| Sol.madre Azul Coomassie | 62.5 ml |
| Metanol absoluto | 250.0 ml |

Ac. acetico glacial	50.0 ml
Agua bidestilada	137.5 ml

K).- Decolorante para gel I

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

L).- Decolorante para gel II

Ac. acético glacial	7.0 ml
Agua bidestilada	93.0 ml

M).- Equipo para desarrollar la técnica:

Equipo para electroforesis vertical de Hoefer
Scientific Instruments, Mod. SE 600
Congelador a -20° C
Refrigerador a 4° C
Fuente de poder para electroforesis Hoefer
Scientific Instruments, 500 v, 250 mA

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

a).- Regulador de transferencia

Trizma base	9.07 ml
Glicina	43.2 ml
Metanol absoluto	600.0 ml
Agua bidestilada	2400.0 ml

b).- Tinción de proteínas transferidas

Tinta china (pelikan)	20.0 ml
PBS 0.1 M, Tween 20 al 0.3 %, pH 7.2	10.0 ml

c).- Equipo para desarrollar la técnica:

Cámara de electrotransferencia, Hoefer, Sci.
Inst., Mod. TE 42
Fuente de poder, Hoefer Sci. Inst. Mod. TE 51
0.100 VDC, 0-2 A.

Papel de nitrocelulosa de 0.45 micras de poro, marca Sartorius (Cat. 9-64-955, Lot. 5002679).

5.- Reactivos y equipo para desarrollar la técnica de inmuno detección. Todos de Sigma, Co. y los solventes de Baker, S.A..

a).- Regulador salina-fosfatos (PBS) 10X, 0.1 M, pH 7.2

NaCl 80.0 g

KH₂PO₄ 2.0 g

Na₂HPO₄ 29.0 g

KCl 2.0 g

Agua bidestilada 900 ml ajustar el pH 7.4 y posteriormente aforar con agua a 1 ltr.

b).- Regulador de bloqueo

Gelatina 6.25 g

Disolver en 200 ml de agua bidestilada caliente.

EDTA (Etilen-dinitrilo-tetraacético di sodico)

4.54 g

PBS 10X 250.0 ml

Tween 20 2.5 ml

Agua bidestilada 1.5 ltr.

Ajustar pH 7.3

Aforar con agua bidestilada a 2.5 ltr.

c).- Los sueros por analizar así como el conjugado antiinmunoglobulina humana, son diluidos en regulador de bloqueo.

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

PBS 10X 100.0 ml

Tween 20 1.0 ml

Agua bidestilada 900.0 ml

e).- Regulador de lavado PBS 1X

PBS 10X 100.0 ml
Aforar con agua bidestilada hasta 1 ltr.

f).- Sustrato para la peroxidasa

4-cloro-1-naftol	30.0 mg
Metanol absoluto	10.0 ml
PBS 1X	50.0 ml
Peróxido de hidrógeno	50.0 ml

C.- MATERIAL BIOLÓGICO

a).- Sueros humanos:

- 26 muestras de sueros correspondientes a pacientes con EA. Diagnosticados por el servicio de Reumatología del Hospital General de México.

- 56 muestras de sueros correspondientes a sujetos aparentemente sanos, todos familiares de los pacientes.

b).- Cepas bacterianas.

Núm. de Cepa
en el lab.

24	<u>Klebsiella pneumoniae</u>
25	<u>Klebsiella pneumoniae</u>
33	<u>Klebsiella pneumoniae</u>
50	<u>Klebsiella pneumoniae</u>
51	<u>Klebsiella pneumoniae</u>
52	<u>Escherichia coli</u>
53	<u>Enterobacter spp</u>
54	<u>Enterobacter agglomeris</u>
55	<u>Salmonella typhi</u>
56	<u>Salmonella typhimurium</u>
57	<u>Shigella flexneri</u>
58	<u>Yersinia enterocolitica</u>

Las cepas 24, 25, 33 fueron obtenidas de infecciones intrahospitalarias, en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Las cepas 50 a la 54, fueron obtenidas de pacientes con Espondilitis Anquilosante (EA) definida, en el Hospital General de México.

Las cepas de la 55 a la 58, fueron donadas del Cepario del Depto. de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

c).- Conjugados: Inmunoglobulina G (IgG) de cabra anti-inmunoglobulina humanas totales (IgA, IgG, e IgM).

Inmunoglobulina G (IgG) de cabra anti-inmunoglobulina humana A (IgA).
Inmunoglobulina G (IgG) de cabra anti-inmunoglobulina Humana M (IgM).
Inmunoglobulina G (IgG) de cabra anti-inmunoglobulina humana G (IgG), conjugadas a peroxidasa (Cappel Cat. 3601, Lote # 0121).

M E T O D O S :

- 1).- Los sueros fueron obtenidos de sangre venosa y se guardaron en alícuotas de 200 microlitros a -20° C.
- 2).- Determinación de la Actividad de la Nitrogenasa mediante la reducción de acetileno (62) como sigue:
 - a) Se preparó medio semisólido E+ y E- en viales de 5 ml. Cada cepa se sembró por punción en cada vial, se incubó el medio E+ por 12 horas a 37° C y el medio E- por 5 días a 20° C.
 - b) Las bacterias crecidas en viales como los medios semisólidos, fueron cerradas con tapón de caucho.
 - c) Se extrajo 1 ml de la atmósfera de cada vial para inyectar 1 ml de acetileno e incubar 1 hora a 37 y 20° C respectivamente.
 - d) Transcurrido el tiempo se sacó 1 ml, de la atmósfera de cada vial y se inyectó en el cromatógrafo de gases previamente calibrado para el tiempo de retención del acetileno y etileno.
 - e) Se determinó cualitativamente la presencia de la enzima nitrogenasa, para cada una de las condiciones de cultivo.
 - f) Se confirmaron para las cepas 24, 25 y 33 la presencia o no de la enzima. Y para las cepas 50 a la 58, algunas de ellas no existen reporte de que fijen nitrógeno. Las cuales se tomaron como testigos negativos, además se utilizó el Azospirillum como testigo positivo.
- 3).- Se determinaron curvas de crecimiento para todas las cepas en los medios E+, E- y Caldo soya tripticaseína, por el método nefelométrico a 450 nm de longitud de onda.

- 4).- Las cepas crecieron en medio E+ líquido por 5 horas a 37° C, en E- 5 días líquido y para caldo soya tripticaseína por 4 horas a 37° C. (datos no mostrados).
- 5).- Transcurrido el tiempo para cada uno de los medios las bacterias se cosecharon por centrifugación a 7000 rpm durante 20 min. el paquete bacteriano se lavó 3 veces con solución salina fisiológica estéril y se guardo en alícuotas de 200 microlitros en congelación hasta su uso.
- 6).- Preparación de las muestras para su análisis electroforético (para las diferentes condiciones de cultivo).
- a) Se ajustó el paquete bacteriano con solución salina fisiológica a las siguientes densidades ópticas: 0.4, 0.6, 0.8 a 540 nm de longitud de onda.
- b) De la suspensión ajustada se tomaron 10 ml y se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 min., se descartó el sobrenadante y se adicionaron al paquete 500 microlitros de regulador de muestra 2X, se colocaron en baño de agua hirviendo durante 10 min. se microcentrifugaron a 2500 rpm durante 10 min. y se descarto el paquete.
- 7).- Para la electroforesis en geles de poliácridamida-SDS (PAGE-SDS); se utilizó el sistema de reguladores discontinuos Laemmli (63):
- a) Electroforesis en geles de poliácridamida al 12% con 1.5 mm de grosor:
Gel separador: Se montó el aparato perfectamente limpio y desengrasado, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En un matraz Kitasato se colocan en orden los siguientes reactivos:
- | | |
|--------------------|---------|
| Soln. de monómeros | 12.0 ml |
| Tris 1.5 M pH 8.8 | 7.5 ml |

SDS al 10%	0.6 ml
Agua bidestilada	10.05 ml
Persulfato de amonio	0.15 ml
TEMED	0.01 ml

Se agitó la mezcla y se adicionó entre las dos placas de vidrio, hasta aproximadamente 4.5 cm del borde superior e inmediatamente se adicionó sobre la superficie 5ml de agua bidestilada. Se dejó gelificar por 15 min. aproximadamente en seguida se lavo 5 veces con agua bidestilada. Se escurrió perfectamente la superficie del gel y se colocó el peine apropiado para el gel concentrador (10.15 carriles o ciego) para el análisis electroferético y electrotransferencia.

Gel concentrador:

En un matraz Kitasato se realiza la siguiente preparación:

Soln. de monómeros	1.33 ml
Tris 1.5 M pH 6.8	2.50 ml
SDS al 10%	0.20 ml
Agua bidestilada	6.10 ml
Persulfato de amonio	0.05 ml
TEMED	0.005 ml

Se agregó ésta mezcla sobre el gel separador, teniendo cuidado de no dejar burbójas en el peine, una vez que gelificó se lavó con agua bidestilada.

En seguida se montaron las placas en el aparato y se llenaron los tanques con regulador de corrimiento. Se colocaron en cada pozo 10 a 60 microlitros de las muestras por analizar y en al menos 1 pozo 10 microlitros de una mezcla de los siguientes marcadores de peso molecular: dilución 1:10 en regulador de muestra.

Albúmina bovina	66 kDa
Albúmina de huevo	45 kDa

Gliceraldehído 3-		
fosfato deshidrogenasa	36	kDa
Anhidrasa carbónica	29	kDa
Tripsinógeno	24	kDa
Inhibidor de tripsina	20.1	kDa
Alfa-lactoalbúmina	14.2	kDa

Se conectó la fuente de poder y se aplicó una corriente constante de 15 mA (60 volts), cuando la marca de azul de bromofenol penetró al gel separador, se aumentó la corriente a 30 mA y se dejó correr hasta que la marca de azul de bromofenol llegó a 0.5 cm. del borde inferior del gel (voltaje final no mayor de 200 volts). Se desmontó el aparato y el gel se sumergió por 12 horas en solución colorante de Coomassie al 0.125% metanol-ácido acético, se removió el colorante y en seguida se sumergió en solución decolorante I haciendo tantos cambios como fué necesario hasta lograr una nitidez adecuada de las bandas. Se agregó decolorante II para preservar el gel y su posterior análisis.

8).- Electrotransferencia según la técnica de Towin (64).

Se trabajo la muestra a una D.O de 0.8 para mostrar una buena resolución. Se realizo SDS-PAGE al 12% y se colocaron 700 microlitros de la muestra de un peine ciego con un diente para marcadores de peso molecular. Terminado el corrimiento se corto el extremo del peine ciego, para su tinción con azul de Coomassie, el resto se procedió a transferir a papel de nitrocelulosa como sigue:

- a) Se remojaron en regulador de transferencia 3 hojas de papel de filtro del # 40, una hoja de papel whatman # 1 y una hoja de papel de nitrocelulosa, todos de 13x15cm. Tambien se remojaron dos hojas de fibra Scotch de 16x16x0.3cm.
- b) Se armó el presente cassette del aparato de transferencia como sigue:

Rejilla de plástico
Fibra Scotch
Papel filtro #40
Papel de Nitrocelulosa
Gel ya corrido electroforéticamente

En seguida se marcaron el frente electroforético, el inicio del separador, los extremos y el sitio en donde se encontraban los marcadores de peso molecular, en seguida:

Papel filtro #40
Fibra Scotch
Rejilla de plástico

- c) Se cerró y se colocó en la cámara de transferencia quedando el gel en el polo negativo y el papel de nitrocelulosa en el polo positivo.
- d) Se sometió a una corriente de 1 amper por 3 horas o 90 mA por 12 horas.
- e) Al término de la transferencia se desarmó el cassette y se cortó una tira de papel de nitrocelulosa del lado en que se encontraban los marcadores de peso molecular y éste se procedió a sumergirlo en solución de tinta china-PBS-Tween 20 al 0.3% y así observar el patrón de proteínas totales transferidas (65).

9.- Inmunodetección:

- a) El papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas, se sumergió en regulador de bloqueo por 2 horas a 37° C y se cortaron tiras de 0.5 cm guardándose en regulador a 4° C hasta su uso.
- b) Cada tira se incubó en 2 ml de cada uno de los sueros por analizar diluidos en regulador de bloqueo 1:50, durante 2 horas a 37° C y después toda la noche a 4°C.
- c) Se lavó 5 veces con PBS-Tween 20 al 0.1%, 1 min. cada vez y se incubó con 2 ml de IgG de

cabra conjugada a peroxidasa anti-inmunoglobulinas totales, anti-IgA, anti-IgM, anti-IgG según el caso, diluidas 1:1000 en regulador de bloqueo, por espacio de 2 horas a 37° C.

- d) Se lavó 7 veces con PBS-Tween 20 al 0.1% y 5 veces con PBS 1X, un minuto cada vez. Se agregó 2 ml del sustrato de peroxidasa hasta la aparición de bandas. Finalmente se detuvo la actividad enzimática agregando agua destilada (choque hipotónico), y se dejó secar para su análisis.

10).- Análisis de resultados:

- a) Se determinó el peso molecular de las proteínas reconocidas por los sueros de las diferentes enterobacterias, con énfasis en la p55 kDa, calculando el Rf, tomando para esto la referencia de los marcadores de peso molecular:

$$\text{Rf} = \frac{\text{Distancia de la parte superior del gel a la banda de proteína}}{\text{Distancia de la parte superior del gel al frente del azul de bromofenol}}$$

- b) El Rf se graficó contra el log del peso molecular de los marcadores y por interpolación en la curva se conocen los pesos moleculares de los antígenos reconocidos, principalmente la p55 kDa.

TABLA 2 MARCADORES DE PESO MOLECULAR

Marcadores de peso molecular	Peso molecular (en daltones)	log 10 del PM	Rf
Albúmina bovina	66 000	4.8195	0.2301
Albúmina de huevo	45 000	4.6532	0.3590
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	36 000	4.5563	0.4407
Anhidrasa carbónica	29 000	4.4623	0.5707
Tripsinógeno	22 000	4.3803	0.6133
Inhibidor de tripsina	20 100	4.3031	0.7756
Alfa-lactalbúmina	14 200	4.1522	0.3470

Utilizados en el corrimiento electroforético, para la determinación del peso molecular de las proteínas enterobacterianas.

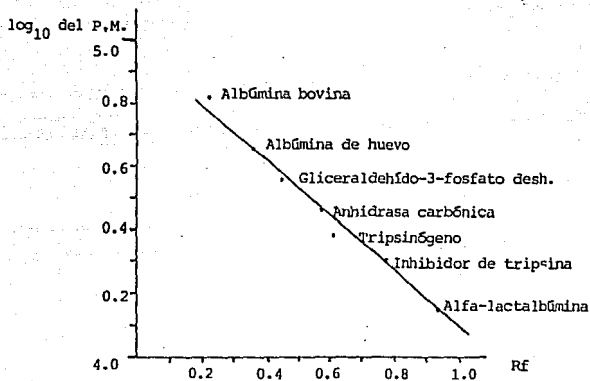


FIG II Recta de marcadores de PM en SDS-PAGE al 12%

RESULTADOS

1.- Análisis de los sueros de individuos B27+ y B27- frente a p55 de Klebsiella pneumoniae por IET.

Se utilizó a la cepa 50 de Klebsiella pneumoniae la cual presenta actividad de nitrogenasa en los medios E+ y E-, para corroborar la respuesta diferencial hacia el antígeno p55. En la fig. III se muestra el reconocimiento selectivo de 10 pacientes B27+ con reconocimiento intenso ($VR= 7.35 \pm 4.31$) y 10 pacientes B27- con reconocimiento débil ($VR= 1.8 \pm 1.68$) lecturas registradas en espectrofotómetro de rastreo con registrador e integrador (Shimatzu DR-2), el cual lee intensidades de color a una longitud de onda de 500 nm (datos no mostrados).

En la tabla III, se agrupan todos los sueros analizados de acuerdo al reconocimiento diferencial para p55 y al marcador B27+ y B27-, el análisis estadístico utilizado fué X (66).

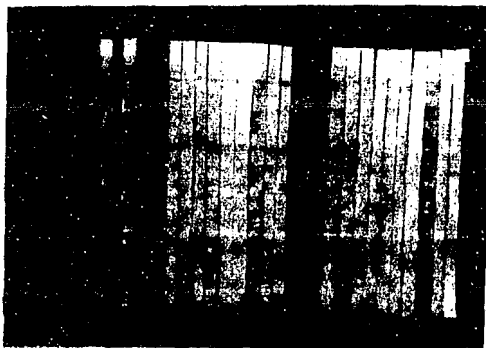


FIG III.- Reconocimiento de proteínas de Klebsiella pneumoniae, Cepa 50 carril A respuesta intensa a p55, carril B respuesta débil bloque C respuesta intensa, bloque D respuesta débil (bloque 10 sujetos).

TABLA 3 RECONOCIMIENTO DE LA PROTEINA p55

HLA-B27	RECONOCIMIENTO		TOTAL	p > ^a 0.05
	Débil	Fuerte		
B27+	14	41	55	
B27-	18	9	27	

$$a = \chi^2$$

Análisis de frecuencias χ^2 para determinar su significancia.

2.- Caracterización de la p55

A) Producción de nitrogenasa

A las cepas seleccionadas, se les determino la ausencia o presencia de la enzima nitrogenasa por el método reportado por Schrollhon (41), reducción de acetileno, el cual es práctico, obteniéndose los resultados mostrados en la tabla IV; en la fig. IV se ilustra la actividad enzimática dada por la cepa 50 (Cualitativa).

**TABLA 4 FUENTE DE AISLAMIENTO Y DETERMINACION DE
 . NITROGENASA PARA DIFERENTES CEPAS
 ENTEROBACTERIANAS.**

CLAVE DEL LABORATORIO	FUENTE DE AISLAMIENTO	NITROGENASA	
		(E+)	(E-)
3	coprocultivo	+	+
22	hemocultivo	-	+
24	hemocultivo	-	+
25	hemocultivo	+	+
50	coprocultivo	+	+
51	coprocultivo	+	+
52	coprocultivo	+	+
53	coprocultivo	-	-
54	coprocultivo	-	-
<p> CEPAS DONADAS POR EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL I.P.N. </p>			
55		-	-
56		-	-
57		-	-
58		-	-

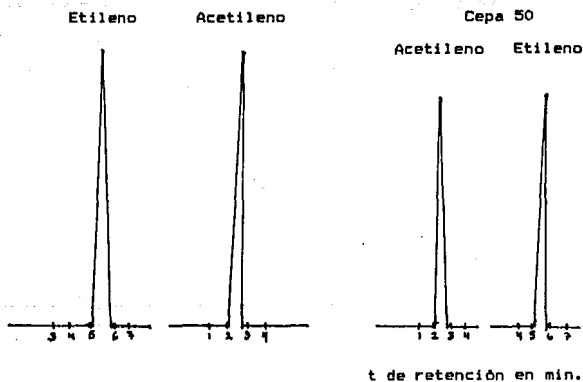


FIG IV.- Esquema del cromatograma obtenido para la determinación de la actividad de nitrogenasa determinado acetileno y etileno.

B) PAGE de Klebsiella pneumoniae

Se obtuvieron los patrones electroforéticos (proteínas totales) para diferentes cepas de Klebsiella pneumoniae crecidas en el medio originalmente diseñado por Vogel-Bonner (68) E+ y E- datos mostrados en la fig V observandose proteínas constitutivas de la bacteria bajo las diferentes condiciones de cultivo.



FIG V.- Electroforesis de Klebsiella pneumoniae en SDS-PAGE al 12%. Carril A marcadores de peso molecular, carriles B y C cepa 22, carriles D y E cepa 50, carriles F y G cepa 51 medios E+ y E- respectivamente.

Cepa 22 Klebsiella pneumoniae
Cepa 50 Klebsiella pneumoniae
Cepa 51 Klebsiella pneumoniae

C) IET de proteínas totales de Klebsiella pneumoniae frente a un suero B27+ con respuesta intensa.

Ya teniendo caracterizado el patrón electroforético de Klebsiella pneumoniae, se realizó una inmunodetección para Klebsiellas con actividad de nitrogenasa y sin ella; datos mostrados en la fig VI.



FIG VI.- Reconocimiento por IET de proteínas de diferentes cepas de Klebsiella pneumoniae crecidas en medio E+, carril A marcadores de peso molecular, carril B cepa 33, carril C cepa 22, carril D cepa 25, carril E cepa 50, carril F cepa 51 por un suero B27+ con respuesta intensa.

	Actividad de nitrogenasa	
	E+	E-
Cepa 33	-	-
Cepa 22	-	+
Cepa 25	+	-
Cepa 50	+	+
Cepa 51	+	+

D) Producción de p55 en diferentes medios .

I) PAGE de Klebsiella pneumoniae en diferentes medios.

Ya teniendo estandarizados los patrones electroforéticos de Klebsiella pneumoniae en medio E+ y E-, se penso en obtener la masa bacteriana en un medio más rico, caldo soya tripticaseína para posteriormente analizarlo por IET, fig VII.

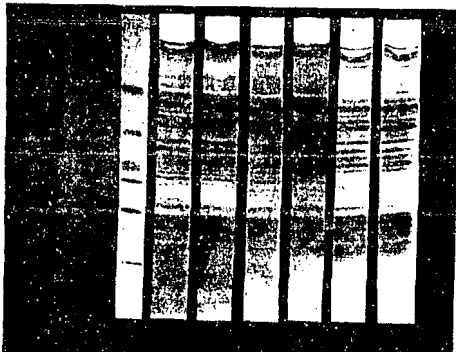


FIG VII.- Electroforesis de Klebsiella pneumoniae en SDS-PAGE al 12%, carril A marcadores de peso molecular, carriles B,C cepa 50 crecida en medio E-, carriles D,E crecida en E+, carriles F,G crecida en caldo soya tripticaseina.
Cepa 50 Klebsiella pneumoniae.

II) IET de Klebsiella pneumoniae en diferentes medios.

La cepa 50 de Klebsiella pneumoniae fué crecida en los medios E-,E+ y caldo soya tripticaseína, los patrones electroforéticos ya transferidos fueron enfrentados con un suero B27+ con respuesta intensa a p55 y con un suero B27- con respuesta débil, datos mostrados en la fig VIII.

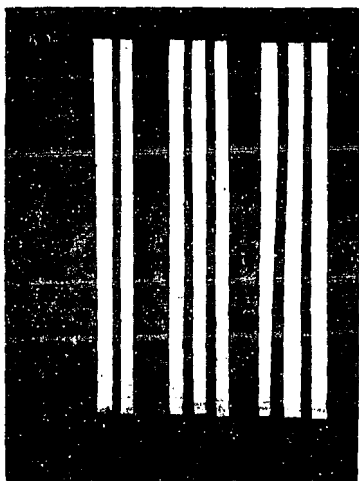


FIG VIII. IET de proteínas de Klebsiella pneumoniae cepa 50 carriles A,B cepa crecida en medio E+, A reconocimiento intenso, B reconocimiento débil. Carriles C,F cepa crecida en medio E-, carriles D,G cepa crecida en medio E+ y carriles E,H cepa crecida en caldo soya tripticaseína. Carriles C-E reconocimiento intenso, carriles F-H reconocimiento débil para p55.

3) Presencia de p55 en otras enterobacterias.

A) PAGE de diferentes cepas de enterobacterias en caldo soya tripticaseína.

Se realizó una selección de diferentes enterobacterias conociendo los estándares de proteínas en tres medios diferentes E-, E+ y caldo soya tripticaseína, en la fig. IX se muestran los patrones electroforéticos de las diferentes enterobacterias seleccionadas crecidas en caldo soya tripticaseína.



FIG IX.- Electroforesis de diferentes enterobacterias en SDS-PAGE al 12 %, carril A marcadores de peso molecular, carril B cepa 50, carril C cepa 52, carril D cepa 54, carril E cepa 55, carril F cepa 56, carril G cepa 57, carril H cepa 58; carriles B-H cepas crecidas en caldo soya tripticaseina.

Cepa 50	<u>Klebsiella pneumoniae</u>
Cepa 52	<u>Escherichia coli</u>
Cepa 54	<u>Enterobacter agglomerans</u>
Cepa 55	<u>Salmonella typhi</u>
Cepa 56	<u>Salmonella thyphimurium</u>
Cepa 57	<u>Shigella flexneri</u>
Cepa 58	<u>Yersinia enterocolitica</u>

B) IET de diferentes enterobacterias.

El patrón electroforético de las diferentes enterobacterias las cuales fueron transferidas y enfrentadas a sueros B27+ (reconocimiento intenso) y B27- (reconocimiento débil), datos mostrados en la fig X.



FIG. X IET de proteínas totales de diferentes enterobacterias crecidas en caldo soya tripticaseína.
 carriles A,I cepa 50, carriles B,J cepa 52,
 carriles C,K cepa 53, carriles D,L cepa 54,
 carriles E,M cepa 55, carriles F,N cepa 56,
 carriles G,O cepa 57, carriles H,P cepa 58;
 carriles A-H reveladas con suero B27- respuesta
 debil, carriles I-P reveladas con suero B27+
 respuesta intensa.

cepa 50 Klebsiella pneumoniae
 cepa 52 Escherichia coli
 cepa 53 Enterobacter spp
 cepa 54 Enterobacter agglomeris
 cepa 55 Salmonella thyphi
 cepa 56 Salmonella thyphimurium
 cepa 57 Shigella flexneri
 cepa 58 Yersinia enterocolitica

4) Reconocimiento por anticuerpos de los sueros de pacientes con EA y HLA B27+ contra sus propias enterobacterias.

Era interesante conocer como respondian los pacientes con EA frente a p55 en bacterias aisladas en sus propias heces, por medio de IET mostrada en la fig. XI.

ESTA TESTIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

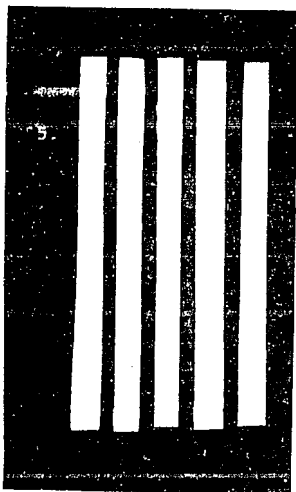


FIG XI.- Patrón de reconocimiento para proteínas de diferentes cepas aisladas por coprocultivo en los mismos probandos con HLA-B27, carril A cepa 54 reconocimiento intenso, carril B cepa 53 reconocimiento débil, carril C cepa 52 reconocimiento débil, carril D cepa 51 reconocimiento intenso, carril E cepa 50 reconocimiento intenso.

Cepa 54 Enterobacter agglomeris
 Cepa 53 Enterobacter ssp
 Cepa 52 Escherichia coli
 Cepa 51 Klebsiella pneumoniae
 Cepa 50 Klebsiella pneumoniae

5) Determinación del isotipo del anticuerpo que reconoce a p55.

Conociendo muchas de las características de la p55 se diseñó un análisis por IET del isotipo que reconoce a este antígeno bacteriano, fig. XII

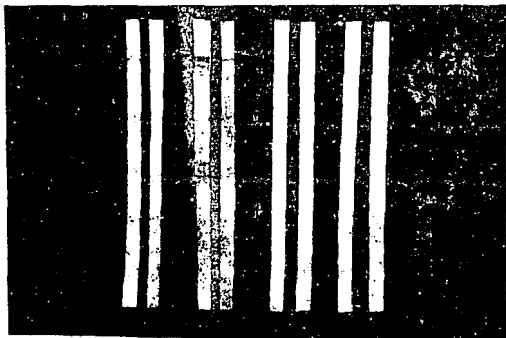


FIG XII.- Patrón de reconocimiento de proteínas de Klebsiella pneumoniae cepa 50 carril A respuesta intensa a p55, carril B respuesta debil, A,B reveladas con antiinmunoglobulinas totales (IgG, IgM e IgA). Carriles C,D revelados con anti-IgG, carriles E,F revelados con anti-IgA, carriles G,H revelados con anti-IgM, carriles C-H suero con respuesta intensa a p55.

DISCUSION

Siguiendo las condiciones de trabajo establecidas en nuestro laboratorio de investigación y anteriormente reportadas en donde se utilizó medio con sales de nitrógeno E+ diseñado originalmente por Vogel-Bonner (67), fué modificado estequiometricamente para crear el medio libre de nitrógeno E-, se determinaron las condiciones óptimas de cultivo para Klebsiella pneumoniae previamente citadas.

La cepa de Klebsiella pneumoniae anteriormente trabajada era la cepa 22 (nomenclatura del laboratorio) mostro gran actividad de nitrogenasa y por medio de la técnica de IET se observó un reconocimiento selectivo por probandos HLA-B27+, en relación con el cuadro clínico hacia una proteína de peso molecular de 55 KDa denominada p55.

PLANTEAMIENTO:

- 1) ¿ El reconocimiento diferencial era estadísticamente significativo ?
- 2) ¿ Era la enzima nitrogenasa la responsable del reconocimiento preferencial hacia p55.
- 3) Puesto que utilizando medios de cultivo diferentes existían variantes en los patrones electroforéticos, ¿ De que manera era afectado el reconocimiento selectivo ?
- 4) El reconocimiento diferencial para p55 era exclusivo del género Klebsiella.

Como puede observarse, estas interrogantes giran alrededor de la hipótesis de mimetismo molecular (Ebringer) (28-30).

De acuerdo con las interrogantes planteadas, abordamos el trabajo de la siguiente manera:

Se optó por cambiar la cepa 22 por la cepa 50 la cual proviene de un paciente con EA definida aislada de coprocultivo lo cual nos pareció más atractivo, esta cepa presentaba una actividad de nitrogenasa en los medios E+ y E-.

Al ampliar el número de probandos en estudio se tendría mayor significancia estadística y ratificar o eliminar las aseveraciones dadas anteriormente:

- 1) El reconocimiento selectivo a p55 no está relacionado con el cuadro clínico.
- 2) El reconocimiento selectivo a p55 está relacionado de alguna manera con la presencia del antígeno HLA-B27.

Se trabajó con 26 muestras de sueros correspondientes a pacientes con EA definida, Diagnosticados por el servicio de Reumatología del Hospital General de México y 56 muestras de sueros correspondientes a sujetos aparentemente sanos, todos familiares de los pacientes.

Se agruparon a los sueros de acuerdo con la presencia o no del HLA-B27 y al reconocimiento a p55, algunos sujetos responden intensamente a ese antígeno en tanto que otros lo hacen de manera débil fig III.

Al realizar el análisis de los probandos localizados en uno u otro grupo, se encontró que no existen diferencias en el reconocimiento de este antígeno en relación a su estado clínico, pero sí con la presencia del HLA-B27+ pues el 41/55 o el 74.5% mostraron una respuesta intensa y el 9/27 o 33% de los HLA-B27- presentaron esa característica ($p < 0.05$). Con respecto a la capacidad débil de respuesta el 14/55 o 25.5% de los HLA-B27+ presentaron esa característica y los HLA-B27- 18/27 o 66% se manifestaron de igual manera tabla 3.

Los resultados de este trabajo confirman claramente que la magnitud de la respuesta de anticuerpos para p55 de Klebsiella pneumoniae se encuentra relacionada de alguna manera con la presencia del antígeno HLA-B27, con una significancia estadística X^2 (68).

Como puede observarse se contaba ya con un panel rico de Klebsiella (con actividad o sin ella de fijación de nitrógeno), ya identificadas por los Departamentos de Bacteriología respectivos de cada fuente de obtención (31,32) tabla 4 y fig. IV. De esta manera se contó con variables para tratar de darle respuestas a las interrogantes planteadas.

Siempre se identificaron las bandas correspondientes a p55 de acuerdo con el Rf obtenido en cada corrimiento teniendo como estándares los marcadores de peso molecular mostrados en la tabla 2 y fig. II respectivamente.

En la fig. V se muestran los patrones electroforéticos de proteínas totales en medios E+ y E- para las cepas 22, 30, 51 de Klebsiella pneumoniae como puede observarse el patrón electroforético de proteínas totales presentados por estas cepas para medio E+ es por mucho más rico en bandas proteicas que para el medio E-.

Para determinar si ¿ Era la nitrogenasa ? la responsable del reconocimiento diferencial, se plantearon diferentes experimentos:

En la fig. VI se muestra el reconocimiento proteico de un paciente con EA siendo B27+ frente a diferentes cepas de Klebsiella pneumoniae las cuales presentan características de ausencia y fijación de nitrógeno atmosférico, se observó reconocimiento a p55 en todas las cepas trabajadas, lo cual nos daba un indicio para suponer que este reconocimiento selectivo no involucraba a la nitrogenasa de Klebsiella pneumoniae; lo mas probable es que se trate de una molécula o moléculas que migran conjuntamente sin relacionarse con la fijación de nitrógeno.

Para llevar acabo está aseveración, se incluyó al desarrollo un medio donde fuera menos requerida la presencia de la nitrogenasa, se pensó en caldo soya tripticaseína, realizando previamente la estandarización del tiempo de cultivo, la masa bacteriana obtenida se trató de la misma manera establecida para los medios E+ y E-.

La fig. VII muestra patrones electroforéticos de Klebsiella pneumoniae crecida en caldo soya tripticaseína, E+ y E- con algunas diferencias pero con un número similar de bandas proteicas para los medios E+ y caldo soya tripticaseína, no así para el medio E- pues presento menor cantidad de bandas proteicas. De esta manera se le proporcionaba a la bacteria medio donde la actividad de nitrógeno se expresara al máximo E- y medio donde no fuera necesaria esta activación E+ siendo menor aun en caldo soya tripticaseína, tomando en cuenta que el complejo de nitrogenasa era inducible expresándose cuando las concentraciones de nitrógeno son escasas (33).

El extracto proteico bajo estas tres condiciones de cultivo de la cepa 50 de Klebsiella pneumoniae se enfrento a sueros B27+ con respuesta intensa y B27- con respuesta débil hacia p55; el reconocimiento a p55 no fue mayor en ninguno de los medios cuando se enfrentó a suero con respuesta intensa pero si cuando se enfrentó con un suero con respuesta débil. fig. VIII.

Se han involucrado a diferentes microorganismos gram negativos con la EA (25-30), se seleccionaron a los géneros Escherichia, Enterobacter, Salmonella, Shigella, Yersinia por existir reportes donde los involucran de alguna manera con las espondiloartropatías seronegativas (30-35), se determinó si el reconocimiento diferencial era exclusivo del género Klebsiella o se encontraba de la misma manera en otros géneros enterobacterianos.

En la fig. X por IET se enfrentan extractos enterobacterianos a un suero B27+ (respuesta intensa) y uno B27- (respuesta débil), las cepas crecidas en caldo soya tripticaseína; como se observa existe el reconocimiento diferencial marcado por los sueros, lo que indica que la p55 se encuentra en todos los géneros estudiados. Sin embargo existe otra proteína la cual es también diferenciada por los sueros B27+ como la h-homp de 35 kDa reportada por Bohemen (45).

Era interesante conocer como sería la respuesta de anticuerpos de pacientes con EA, HLA-B27+ frente a p55 de cepas enterobacterianas aisladas de sus propias heces, en cinco pacientes analizados 3/5 ó 60% de ellos reconocieron a el antígeno (p55), mientras que 2/5 ó 40% presentaron reconocimiento débil, lo cual indicaba que en este reconocimiento diferencial no se involucraba el cuadro clínico. fig. XI.

Al determinar el isotipo del anticuerpo que reconoce a p55, fig. XII fué de la clase IgG lo que indica respuesta secundaria hacia el antígeno por vía sistémica, involucrando a las células T en ella.

CONCLUSIONES

- 1) Se demostró que la magnitud de la respuesta de anticuerpos contra la proteína de 55 KDa denominada p55, se relaciona de alguna manera con la presencia del HLA-B27, no así con el cuadro clínico.
- 2) Se comprobó que el reconocimiento diferencial se da para una proteína constitutiva, probablemente se trate de varias moléculas cuyo peso similar las hace migrar conjuntamente, ese o esos componentes no se encuentran ligados a mecanismos de fijación de nitrógeno.
- 3) Se demostró que p55 se encuentra presente bajo diferentes condiciones de cultivo.
- 4) El reconocimiento diferencial a p55 por individuos B27+ y B27- no es exclusivo del género Klebsiella pues se da en otros generos enterobacterianos.
- 5) El anticuerpo que reconoce a p55 es de la clase IgG lo cual implica respuesta a estímulo secundario y sistémico, involucrando a las células T.
- 6) Aunque no se puede concluir que las enterobacterias se involucren en la etiopatogénesis de la EA, se afirma que la presencia del HLA-B27 marca una tendencia de reconocimiento diferente para p55, resultando de gran interés el hallazgo de elementos que puedan contribuir y caracterizar la naturaleza multifactorial de la EA.

A P E N D I C E

En el laboratorio de inmuoquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, se sigue desarrollando investigación referente a la EA determinándose que la p55 es una proteína de Choque térmico contribuyendo a la posible etiología de la enfermedad.

Sabiendo que las proteínas de choque son antígenos inmunodominantes y considerando que la p55 se encuentra relacionada con la presencia del HLA-B27 será posible conocer eventos del sistema inmunológico los cuales podrían ser una contribución a la inmunología básica en el campo de la reumatología.

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla	1 Distribución racial de alelos HLA-B27.....	17
	2 Marcadores de peso molecular.....	39
	3 Reconocimiento de la proteína p55.....	43
	4 Fuente de aislamiento y determinación de nitrogenasa de diferentes enterobacterias....	45
Fig	I Estructura tridimensional del HLA-B27.....	15
	II Recta de marcadores de peso molecular.....	40
	III Reconocimiento de proteínas de <u>Klebsiella</u> <u>pneumoniae</u>	42
	IV Cromatograma de la actividad de nitrogenasa.....	46
	V Electroforesis de <u>Klebsiella pneumoniae</u>	48
	VI Reconocimiento de proteínas de diferentes cepas de <u>Klebsiella pneumoniae</u>	50
	VII Electroforesis de <u>Klebsiella pneumoniae</u> crecida en diferentes medios.....	52
	VIII Reconocimiento de proteínas de <u>Klebsiella</u> <u>pneumoniae</u> crecida en diferentes medios.....	54
	IX Electroforesis de diferentes cepas enterobacterianas.....	56
	X Reconocimiento de proteínas de diferentes cepas enterobacterianas.....	58
	XI Reconocimiento de proteínas de cepas aisladas de coprocultivo en los mismos probandos.	60
	XII Determinación del isotipo del anticuerpo que reconoce a p55.....	62

ABREVIATURAS

Dodecil sulfato de sodio	SDS
Electroforesis en geles de poliacrilamida	PAGE
Espondilitis anquilosante	EA
Inmunolectrotransferencia	IET
Medio con fuente de nitrógeno	E+
Medio libre de nitrógeno	E-
Peso molecular	PM

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Khan MA, Skosey JL. Ankilosing spondylitis and related spondyloarthropathies. En: Samter m (ed.) Immunological diseases, Vol IV. Boston: Little, Brown and Co. (1988), pp 1509-1553.
- 2.- Burgos-Vargas, R. (1987). Espondilitis anquilosante: Evolución de conceptos. Rev. Mex. Reumat. 2: pp 97-99.
- 3.- Calin A. Ankilosing spondylitis. En: Calin A (ed.) Spondyloarthropathies. Orlando: Grune and Stratton (1984), pp 60-118.
- 4.- Orozco, J.; Navarro, A; Galván, F. y Hernandez, C (1987). Espondilitis anquilosantes: prototipo de las espondiloartropatías seronegativas. Rev. Mex. Reumat. 2: pp 100-111.
- 5.- Wagener, P.; Mau, W.; Zeideler, G; Robin-Win, M. y Deicher, H (1985). HLA-B27 and clinical aspects of ankilosing spondylitis: results of prospective studies. Inm. Rev. 86: pp93-100.
- 6.- Ladd JR, Cassidy JT, Martell W. (1971) Juvenile ankilosing spondylitis. Arthr Rheum, 14: pp 579-590.
- 7.- Burgos-Vargas R, Vázquez-Mellado J. (1988). El reconocimiento y diagnóstico de la espondilitis anquilosante juvenil: análisis clínico y estudio comparativo con la artritis reumatoide juvenil. Biol Med Hosp Infant Méx, 45: pp 500-511.
- 8.- Burgos-Vargas R, Naranjo A, Castillo J, Katona G. (1989) Ankilosing spondylitis in the Mexican mestizo: patters of disease according to age at onset. J Rheumatol, 16: pp186-191.
- 9.- Fraga A, Gorodezky C, Lavalle C, Castro L, Escobar Gutierrez A, (1979) HLA-B27 in Mexican patients with ankilosing spondylitis. Arthr Rheum, 22:pp 302

- 10.- Schaller J, Bitnum S, Wedgwood R J, (1969) Ankilosing with childhood onset. J pediatr, 74: pp 505-516.
- 11.- Scholosstein K, Terasaki P I, Bluestone R, Pearson CM. (1973) High association of an HLA antigen W27, with ankylosing spondylitis. N eng J Med 288: pp 704-706.
- 12.- Orozco-Medina, H. y Vázquez-Escobosa, C. (1981). Antigenos HLA en espondilitis anquilosante. Rev. Invest. Clin (Méx). 33: pp 369-372.
- 13.- Harry G. Bluestein (1988) Anatomic and genetic considerations in the pathogenesis of Ankylosing Spondylitis J of Rheumatology (Supplement 16) vol 15: pp29-32.
- 14.- Schosstein, L ; Terasaki, P ; Bluestone, R y Pearson, C. (1973). HLA-B27 antigen association ankilosing spondylitis. N eng J Med 289: 1020-1022.
- 15.- Khan, Muhammad A. y Skosey, J (1988). Ankylosing Spondylitis and related spondyloarthropathies. En: Immunological Diseases, vol IV, Boston USA, Ed little Brown & Co. pp 1509-1538.
- 16.- Firestein, G. y Cowling, P. (1977) Arthropaties related Spondylitis. New York, Raven Press pp 234-36.
- 17.- Ebringer, A ; Baines, M, y Ptaszynska, T. (1985) Spondyloarthritis uveitis, HLA-B27 and Klebsiella Imm. Rev. 86: pp 101-106.
- 18.- Feltelius, N. (1986). Pulmonaty involvement in ankylosing spondylitis. Ann Rheum. Dis. 45: 736-740.
- 19.- Calin, A (1983). Spondyloarthropaty in caucasians and non-caucasians. J Rheum. 10: pp 10-18.

- 20.- Moll, J. M. (1974). Associations Between ankylosing spondylitis psoriatic arthritis, Reiter's disease, the intestinal arthropaties and Behchet's syndrome. *Medicine (Bal)* 53: 343-364
- 21.- Moderator: David T. Y., Yu. MD discussants: S. Yoon Choo, MD and Terry Schaack, MD: Molecular mimicry in HLA-B27 related Arthritis 1989 *Annals of Internal Medicine* Vol III No. 7 551-591
- 22.- Mc. Devitt, H. O. (1974). HLA, immune response genes and diseases. *Lancet* i: 1269-1275
- 23.- Welch, J.; Avakian, H.; Cowling, P.; Ebringer, A.; Woolwy, P.; Panayi, G. y Ebringer, R. (1980). Ankylosing spondylitis, HLA-b27 and klebsiella. I. Cross-reactivity studies with rabbit antisera. *Br. J. wxp. Path.* 61: 85-91
- 24.- Seager, K.; Bashir, H.; Geczy, A.; Edmonds, J.; De Vere-Tyndall, A. (1971). Evidence for a specific B27-associated cell surface marker on lymphocytes of patients wigh ankylosing spondylitis. *Natur* 277: 68-70
- 25.- Cohen, M. (1985). Antigenic characterization of enterobacteriaceae Associated With Reiter's Syndrome. En: *Advances in inflammation research*. Vol. 9 (the Spondyloarthropathies). New York, Raven Press. pp: 173-177
- 26.- Firestein, G. y Zwaifler, N. (1987). Reactive arthritis *Ann. Rev. Med.* 38: 351-360

- 27.- R. Ebringer Acute anterior uveitis and faecal carriage of gram-negative bacteria 1988 British Journal of Rheumatology Vol 27 (Suppl II) 42-45
- 28.- Druice Cavender and Morris Ziff
Anti-HLA B27 Antibodies in sera from patients with gram-negative bacterial infections 1986 Arthritis and Rheumatism Vol 29 No. 3 352-357
- 29.- Richard B. Raybourne, V. Kelly Bunning and Kristina M. Williams Reaction of anti-HLA-B monoclonal antibodies with envelope proteins of Shigella SPECIES 1988 the Journal of Immunology Vol 140 No 10 3489-3495
- 30.- Muhammad Asim Khan; John Lskosey
Ankylosing spondylitis and related spondyloarthropathies 1988 immunological diseases Vol IV; 1509-1538
- 31.- Ernest Jawetz, Joseph. Melnick, Edward A. Adelberg George F. Brooks, Janet S. Butel, L. Nicholas Ornston Edit. Microbiologia Medica 13a. Edicion Manual moderna 204-206.
- 32.- Mac Faddin Pruebas bioquimicas para la identificacion de bacterias de importancia clinica Wdit. Panamericana 1984 capitulo 34 259-274.
- 33.- Cavender, D y Ziff, M (1986) Anti-HLA-B27 antibodies in sera from patients with gram-negative bacterial infections Arthritis Rheum 29: 352-357
- 34.- Trull, A. Ebringer, A. Phayl G Ebringer, R y James D (1984). HLA-B27 and the immune response to enterobacterial antigens in ankylosing spondylitis. Clin. Exp. Immunol. 55: 74-80

- 35.- Schwimmbeck, P.; Yu, D. y Oldstone, M (1987). Autoantibodies to HLA-B27 in the sera of HLA-B27 patients with ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome. *J. Exp. Med.* 166: 173-181
- 36.- Ogasawara, M.; Kono, S y Yu, D. 1986. Mimicry of human histocompatibility HLA-B27 antigens by *Klebsiella Pneumoniae* *Infect. Immun.* 51: 901-908
- 37.- Robert P. Hausinger and James bryand Howard. Comparison of the iron proteins the nitrogen fixation complexes of *Azotobacter vinelandii*, *Clostridium Pasterianum*, And *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, vol 77 No. 7| 1980, pp 3826-3830
- 38.- Winston J. Brill. Biochemical genetics of nitrogen fixation *Microbiological Reviews*; Sep 1980 vol 44 No. 3 pp 449-467
- 39.- M. Kelly. Comparisons and cross reactions of nitrogenase from *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter chroococcum* and *Bacillus polymyxa*. *Biochimica Et Biophysica acta.* 19| (1969), pp 527-540.
- 40.- Howard Dalton and Leonard E Mortenson. Dinitrogen (N2) fixation (with a biochemical emphasis). *Bacteriological Reviews* vol 36 No 2 june 1972, pp 231-260.
- 41.- Collado, A.; Smarti, R.; Bielsa, I. y Castel, T. (1988). Immunoglobulin A in the skin of patients with ankylosing sponkylitis. *Ann. Theum. Dis.* 47: 1004-1007
- 42.- Cooper, R.; Fraser, S.; Sturrock, C. y Gemmell, C. (1988). Taised titres of anti-klebsiella IgA in ankylosing spondylitis, rheumatoid arthritis, and inflammatory bowel disease. *Br. Med. Jour.* 296: 1432-1434

- 43.- Peeters, A.; Van-Den Wall, W.; Van-Dalsen, A. y Westedt, M. (1988). Relation of microscopic haematuria in ankylosing spondylitis to circulating IgA containing immune complexes. Ann. Rheum. Dis. 47: 645-647
- 44.- Mackiewicz, A.; Khan, M y Reynolds, T. (1989). Serum IgA, acute phase proteins, and glycosylation of a -acid glycoprotein in ankylosing spondylitis. Ann. Rheum. Dis. 48: 99-103
- 45.- Ch. G van Bohemen, E Weterings, H S Goel the, F C Grumat and H C Zanen (1988). Enterobacterial involvement in the pathogenesis of secondary ankylosing spondylitis. British J of Rheumatology 27 (suppl II): pp 61-67.
- 46.- Gunnar Husby, Naoyuke Tsuchiya, Peter L. Schwimmbeck, Andrew Keat, Jon a. Pahle, Michael B.A. Oldstone and Ralph C. Williams Jr. Cross-Reactive epitope with Klebsiella pneumoniae nitrogenase in articular tissue of HLA-B27(+) patients with ankylosing spondylitis 1989 Arthritis and Theumatism Vol 32 No. 4 437-445
- 47.- Lee Scholosstein, M. D., Paul I terasaky, Pn. D, Rodney bluestone, M. D and Carl M. Pearson, M. D High association of an HLA-Antigen W27, with ankylosing spondylitis 1973 the New England Journal of medicine Apr. 5 704-706
- 48.- Richard Benjamin and Peter Parham
Guilt by association : HLA-B27 and ankylosing spondylitis 1990 Immunology today Vol.11 No. 4 137-142
- 49.- Denis Wakefield, M.D, FRACP; tom H. Stahlberg PhD; Auli Toivanen M.D; Kaisa Granfors, PhD; Carolyn Tennant.
Serologic Evidence of Yersinia Infection in patients with anterir uveitis 1990 Arch Ophtholmoi Vol 108 219-221

- 50.- CT Pease, M Fennell and DA Brewerton
Polymorphonuclear leucocyte motility in men with
ankylosing spondylitis 1989 Annuals of the
Rheumatic Diseases 48, 35-41
- 51.- PE Pease, MR Lane, H Chanal, JE Tallack and RN
Allan Gram-Negative bacteria, HLA-B27 and
inflammatory bowel Disease 1988 British J. Of
Rheumatology Vol 27 (suppl II) 29-31.
- 52.- PE Pease, MR Lane, H Chanal, JE Tallack and RN
Allan Cross-Reactivity Studies on bacteria believed
to be associated with inflammatory bowel disease
(IBD), ankylosing spondylitis (AS) and reactive
arthritis (ReA) 1988 British J. of Rheumatology
Vol. 27 (suppl II) 32-33
- 53.- Mitchell L. Cohen; Antigenic Characterization of
Enterobacteriaceae Associated With Reiter's
Syndrome 1985 Advances in Inflammation Research Vol.
9 173-177
- 54.- David Tak Yan Yu Immune Response of Patients with
Reiter's Syndrome to yersinia enterocolitica 1985
Advances in Inflammation Research Vol 9 179-187
- 55.- A. Grönberg, A. Fryden and W Kihlstrom; Humoral
immune response to individual yersinia
enterocolitica antigens in patients with and
without reactive arthritis 1989 Clin. Exp. Immuno.
Vol. 76 361-365
- 56.- Arnason, A.; Thorsteinsson, P (1978). Ankylosing
spondylitis, HLA-B27 and Bf. Lancet i 339-340

- 57.- Geczy, A. Alexander, K.; Gashir, H. y Edmonds, J (1980). A factor (s) in Klebsiella culture filtrates specifically modifies an HLA-B27-associated cell-surface component. Nature 283: 782-784
- 58.- Sullivan, J. y Geczy, A. (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 62: 672-677
- 59.- Druery, C.; Bashir, H. y Geczy, A (1980). Search for Klebsiella cell wall components cross-reactive with lymphocytes of B27 AS
- 60.- Orban, P.; Sullivan, J.; Geczy, A.; upfold, I.; coulitis, N. y bashir, H (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. Wxp. Immunol. 53: 10-16
- 61.- Cameron, F.; Russell, P.; sullivan, J. y Geczy, A. 1983. Is a klebsiella plasmid involves in the aetiology of ankylosing espondylitis in HLA-B27 positive individuals ? Mol. Immunol. 20: 563-566
- 62.- Schöllhorn, R. (1967). Acetyline as a competitive inhibitor of N fixation. Protoc. Natl. Acad. Sci. 58: 213-216
- 63.- Laimmi, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T . Nature 227: 680-685
- 64.- Towbin, H.; Steachelin, T y Gordon, J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulos sheets. Procedure an some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 4350-4354

- 65.- Hancock, K y Tsang, V. (1983). India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. Anal. Biochem. 133: 157-162
- 66.- Ficher, Frederic. (1973). Classical significance test. En: Fundamental Statical Concepts, 1a. Ed., New York USA. Harper and Row pub. pp: 285-292
- 67.- Vogel, H y Bonner, D (1956) Acetylornithinase of Escherichia coli: partial purification and some properties J. Biol. Chem. 218: 97-106