**Evaluación del efecto combinado de la proteína de 30 kDa de *Salmonella typhimurium* y el suero de pacientes con espondilitis anquilosante en la formación de trampas extracelulares de neutrófilos**

**Dalia Verónica Vela Flores**

Juan Manuel Agraz Cibrián, José Francisco Zambrano Zaragoza, Brallan Antonio Mejía Macias, Osmar Miguel Gutierréz Castro

**RESUMEN**

La espodilitis anquilosante (EA) es una enfermedad inflamatoria de origen autoinmune, en la que los mecanismos inmunopatológicos no están completamente descritos, aunque se acepta que tanto factores genéticos, como el gen HLA-B27, y ambientales, como lo son infeccciones con enterobacterias (*Salmonella typhimurium*), se asocian con la enfermedad. *Salmonella typhimurium* poseé una proteína de 30 kDa que se ha asociado con la EA, ya que se ha reportado que los pacientes con EA presentan niveles altos de anticuerpos contra esta proteína. Sin embargo, aún se desconoce el papel que juega lap30 de *S. typhimurium* en la respuesta inmune innata, principalmente la respuesta mediada por neutrófilos. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la p30 de *S. typhimurium* en combinación con suero de pacientes con EA sobre la producción de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). La separación de neutrófilos se realizó mediante un gradiente de densidad. Los estímulos utilizados para inducir NETs fueron; p30 de *S. typhimurium;* p30 de *S. typhimurium* combinada consuero de pacientes con EA o sujetos sanos. Las producción de NETs se observó en microscopio de fluorescencia. Nuestros resultados indican que la p30 de *S. typhimurium* no induce por si misma la liberación de trampas extracelulares. Sin embargo, al estimular con la p30 de *S. typhimurium* combinada con suero de pacientes con EA o sujetos sanos se observó la formación de NETs, siendo mayor la cantidad de NETs formadas al combinar la p30 con suero de pacientes con EA. Por lo que podemos concluir que el suero de pacientes con EA, contienen anticuerpos que interaccionan con la p30 *S. typhimurium* y que debido a esa interacción se forman inmunocomplejos con la capacidad de formar trampas extracelulares de neutrófilos.

**1.INTRODUCCIÓN**

**1.1 Espondilitis anquilosante**

La espondilitis anquilosante (EA) es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta principalmente las articulaciones de la columna vertebral, esta inflamación ocasiona fusión ascendente y progresiva de los cuerpos vertebrales.

La EA afecta con mayor frecuencia a los varones (en una relación de 3:1 respecto de las mujeres) y se presenta principalmente entre los 20-30 años de vida, tiene una prevalencia estimada de 0.1 % en población mundial, pero varía según zona geográfica, etnia, factores genéticos y ambientales (1,2).

La EA es de origen autoinmune, y aunque se desconoce que desencadena la autoinmunidad se sabe que existen diferentes factores genéticos y ambientales que están asociados con el desarrollo de la enfermedad.

La presencia del antígeno leucocitario humano (HLA)-B27 es uno de los factores genéticos más asociados con la EA, ya que aproximadamente el 90% de personas con EA son HLA-B\*27 positivos, sin embargo, sólo el 5% de los individuos con este antígeno desarrolla la EA. (3,4)

Existen otros factores genéticos que se han asociados con EA, como los polimorfismos en el gen que codifica para los receptores para Fc de IgG (FcγR). La unión de estos receptores con sus ligandos desencadena una variedad de señales intracelulares que inducen la activación de mecanismos microbicidas, como fagocitosis, ADCC, síntesis y secreción de citocinas, desgranulación y activación de neutrófilos, proporcionando un vínculo crucial entre la respuesta inmune humoral y celular (5). Se ha descrito que algunos polimorfismos genéticos en el gen que codifica para el FcγR afectan la afinidad del receptor por la IgG y por consecuente, la intensidad de las funciones resultantes de dicha interacción, lo que favorece un incremento en la respuesta inflamatoria (6).

Además de los factores genéticos, es posible que los factores ambientales influyan en el desarrollo de la EA. Dentro de estos factores se incluye la infección por algunas enterobacterias como, *Shigella, Campylobacter, Klebsiella pneumoniae y Salmonella typhimurium* (1,7, 8). A pesar de los conocimientos en la fisiopatología del desarrollo de la EA y la participación de los factores genéticos y ambientales. En la actualidad, es poco lo que se conoce en cuanto a la participación de la respuesta inmune innata y adaptativa en el desarrollo de la espondilitis anquilosante.

**2. ANTECEDENTES**

**2.1 *Salmonella typhimurium* y espondilitis anquilosante**

Como se mencionó anteriormente, las infecciones con agentes bacterianos representan un factor para el desarrollo de EA. En este sentido se ha reportado que existe una asociación entre una proteína de 30 kDa (p30) de *Salmonella typhimurium* con la enfermedad, ya que se ha encontrado que PBMCs de pacientes con EA linfoproliferan en presencia de extracto de *S. typhimurium*, además de que se observa una respuesta celular frente a esta bacteria y a p30 en comparación con sujetos sanos (9). Un estudio demostró que existen niveles altos de anticuerpos IgG totales, IgG1 e IgG3 en pacientes con EA en comparación con grupos sanos, y que estos anticuerpos reconocen a la p30 de *Salmonella typhimurium* (10).

Sin embargo, además de los estudios que demuestran la respuesta linfoproliferativa frente a la p30 de *S. typhimurium*, son pocos los estudios que demuestran la capacidad de respuesta del sistema inmune frente a la p30, tanto a nivel de la respuesta inmune innata y adaptativa.

**2.2 Respuesta inmune innata mediada por neutrófilos**

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra infecciónes. Se compone de barreras físicas, químicas y celulares. Las principales células que participan en esta inmunidad son monocitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, mastocitos y neutrófilos (11)

Los neutrófilos son las primeras células que migran de la sangre a los sitios de infección mediante quimiotaxis (12).

Los mecanismos utilizados por los neutrófilos para eliminar antígenos incluyen fagocitosis, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y liberación de moléculas microbicidas a partir de gránulos (degranulación). Además, en la última década se ha descubierto un nuevo mecanismo microbicida de neutrófilos denominado NETosis (13), en el cual los neutrófilos forman una red de fibras de cromatina que están decoradas con péptidos antimicrobianos derivados de gránulos y enzimas tales como elastasa, catepsina G y mieloperoxidasa. Estas estructuras, llamadas trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), representan una estrategia importante para inmovilizar y eliminar a los microorganismos invasores (14).

Existe una amplia variedad de estímulos que inducen la formación de NETs, incluyendo; hongos, parásitos, virus y bacterias, sin embargo, uno de los compuestos más potentes para la formación de NETS es el Forbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA) (13,15).

**2.2.1 NETs y Autoinmunidad**

A pesar de la relevancia de la NETosis en la defensa contra infecciones, las NETs podrían representar un arma de doble filo para el organismo, puesto que las proteasas contenidas en las trampas pueden ocasionar extenso daño tisular ya que estas trampas extracelulares constituyen una rica fuente de autoantígenos que podrían desencadenar fenómenos autoinmunes. Sustentando esta posibilidad, se ha reportado que muchos de los pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES), una enfermedad autoinmune caracterizada por la producción de anticuerpos contra antígenos nucleares como ADN y ribonucleoproteínas, exhiben una deficiente degradación de NETs, que se acentúa en la fase crítica de la enfermedad. Además de LES, existen otras enfermedades autoinmunes que se han asociado con NETs, tales como artritis reumatoide, psoriasis, vasculitis de vaso pequeño, diabetes mellitus tipo 1 y otras enfermedades autoinflamatorias. Por lo anterior, es de esperar que tanto la generación como la eliminación de las NETs deben ser procesos cuidadosamente regulados (14, 16).

**3. JUSTIFICACIÓN**

La espondilitis anquilosante es una enfermedad de naturaleza autoinmune, en la que los mecanismos inmunopatológicos no están completamente descritos, aunque se acepta que factores genéticos y ambientales se asocian con la enfermedad.

Dentro de los factores ambientales, existen reportes que demuestran la asociación entre infecciones con enterobacterias (i.e. *K. pneumoniae, S. typhimurium*) y la susceptibilidad a desarrollar EA. En este mismo sentido se ha reportado que existe una respuesta linfoproliferativa contra la p30 de *S. typhimurium* y el reconocimiento de esta proteína por anticuerpos específicos presentes en el suero de pacientes con EA.

Los componentes de las trampas extracelulares de neutrófilos juegan un papel importante en el desarrollo de algunas enfermedades autoinmunes. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes que demuestren si la p30 de *S. typhimurium*, o los inmunocomplejos formados por la interacción entre la p30 y los anticuerpos presentes en el suero de pacientes con EA tiene alguna ingerencia en la respuesta inmune innata mediada por neutrófilos (producción de NETs).

Por lo que en este estudio se planteó demostrar el efecto combinado que tiene la proteína de 30 kDa de *Salmonella typhimurium* y el suero de pacientes con espondilitis anquilosante en la producción de trampas extracelulares de neutrófilos.

**4. HIPÓTESIS**

La proteína de 30 kDa de *S. typhimurium,* sola o en combinación con el suero de pacientes con espondilitis anquilosante, induce la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos.

**5. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la proteína de 30 kDa de *S. typhimurium,* sola o en combinación con el suero de pacientes con espondilitis anquilosante, sobre la activación y producción de trampas extracelulares de neutrófilos.

**5.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

**1.** Determinar el efecto de la p30 de *S. typhimurium* en la producción de trampas extracelulares de neutrófilos.

**2.** Evaluar y comparar el efecto de la p30 de *S. typhimurium* en combinación con el suero de pacientes con espondilitis anquilosante o sujetos sanos sobre la producción de trampas extracelulares de neutrófilos.

**6. MATERIAL Y MÉTODOS**

**5.2 Metodología**

Se seleccionaron aleatoriamente 5 sueros de pacientes y 5 de sujetos sanos, del banco de muestras del laboratorio de inmunología, los cuales se encuentran alamacenados a -20°C.

Todos los sujetos incluidos en el estudio participaron de forma voluntaria y firmaron una carta de consentimiento informado, de acuerdo con las normas éticas, el Reglamento General de Salud en materia de Investigación para la Salud y con la declaración de Helsinki de 1975 y sus enmiendas.

**5.2.1 Obtención de extracto soluble total de *S. typhimurium* (EST-St)**

Las bacterias se cultivaron en caldo soya de tripticaseína (Bioxon) a 37ºC/24h, y la masa bacteriana se obtuvo y se lavó dos veces Con PBS estéril por centrifugación. El sedimento resultante se resuspendió en PBS y se realizó sonificación (30 ciclos a 5 watts durante 30 s en intervalos de 1 min) en baño de hielo. La preparación antigénica se mantuvo a -20ºC hasta su utilización (10).

**5.2.2 Obtención de la p30 de *Salmonella typhimurium***

Los *pellets* obtenidos a partir de 4 ml de cultivo bacteriano se mezclaron con regulador de muestra (0,5 M Tris-HCl, 1% de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol, 1% de SDS y Cristales de azul de bromofenol) y se desnaturalizaron en baño de agua a ebullición durante 15 min. Las proteínas de *Salmonella typhimurium* se separaron mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras. Después del corrimiento, el gel se tiñó con azul de Coomassie al 0.125% en metanol: ácido acético: agua (5: 1: 2.75) y se decoloró con metanol:agua: ácido acético. La banda correspondiente a la p30 se localizó con ayuda de marcadores de peso molecular y se cortó, para ser electroeluida utilizando el sistema mino-protean II (Bio-rad®). Una vez obtenida, la p30 de concentró y dializó, utilizando el sistema SPIN-X UF. El análisis de la electroelución de la p30 se realizó mediante SDS-PAGE-ME (10).

**5.2.3 Separación de neutrófilos**

Se obtuvieron neutrófilos de sangre periférica mediante un gradiente de densidad. En un tubo cónico de 15 mL se adicionaron 3 mL de Ficoll Histopaque 1119, se estratificaron 3 mL de Ficoll Histopaque 1077. sobre este último, se colocaron 6 mL de sangre total y se centrifugó durante 30 minutos a 700xg. Terminado el tiempo de centrifugación se recuperó el anillo celular que contiene los polimorfonucleares y se realizaron 2 lavados. Después del último lavado, se resuspendió el botón celular en 1 mL de medio RPMI. El conteo y viabilidad celular se realizó en cámara de Neubauer con azul de tripan.

**5.2.5 Inducción y cuantificación de NETs**

La inducción de liberación de trampas extracelulares de neutrófilos se llevó a cabo utilizando Forbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA por sus siglas en ingles) como control positivo, así como los diferentes retos bacterianos a evaluar (p30 de *S. typhimurium*, p30 de *S. typhimurium* combinada con suero de pacientes con EA, p30 de *S. typhimurium* combinada con suero de sujetos sanos). Brevemente, en placas de seis pozos se colocaron 5x105 PMNs en 1 mL de RPMI y se agregaron los inductores de NETs a evaluar, se incubó a 37°C y 5% de CO2 durante 4 horas. Las NETs se fijaron con formaldehido al 4%. Se determinó la presencia de ADN nuclear, con una solución de de 4',6-diamidino-2-fenilindol DAPI a 1 μg/ml. Posteriormente, mediante inmunomarcaje se detectó la elastasa de neutrófilos contenida en las trampas extracelulares, utilizando un anticuerpo primario anti-elastasa y secundario conjugado a Alexa Fluor 488, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia “Zeiss Axio Imager A2”.

**6. RESULTADOS**

Se obtuvieron neutrófilos a partir de sangre periférica de sujetos sanos mediante un gradiente de densidad. Como control negativo se utilizó medio L-15 y PMA como control positivo.

Al estimular a los neutrófilos sólo con la proteína de 30 kDa de S. typhimurium, no se observó la formación de NETs, aunque se observó una disminución en el número de neutrófilos, lo que podría sugerir que la p30 *S. typhimurium* induce muerte celular diferente a NETosis .

En la estimulación de neutrófilos con p30 de *S. typhimurium* combinada con suero de paciente con EA, se observó una mayor producción de NETs en comparación con lo observado cuando se estimularon neutrófilos con la p30 de S*. typhimurium* en combinación con suero de sujetos sanos.

**7. DISCUSIÓN**

Los neutrófilos son la primera línea de defensa de la respuesta inmune innata. Utilizan una amplia gama de mecanismos microbicidas después de ser activados por organismo patógenos, el más reciente mecanismo microbicida descrito de los neutrófilos es la formación de NETs (17), que se encuentra asociada a una forma de muerte celular distinta de la apoptosis y de la necrosis, la cual se denomina NETosis (15).

Existen una amplia gama de inductores de NETs, entre ellos, se ha reportado que *S. typhimurium* tiene la capacidad de producirlos. Sin embargo nuestros resultados demuestran que la p30 de *S. typhimurium* no es capaz de inducir la formación de trampas extracelulares y que además el número de neutrófilos disminuye considerablemente después de ser estimulados con la p30.

Se ha demostrado que la secreción de productos de *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa,* y *Salmonella enteritis* son responsables de la muerte celular de monocitos humanos por apoptosis, de igual forma se ha probado que proteínas bacterianas como las toxinas A-B y algunos superantígenos de *Staphylococcus spp* *y Streptococcus spp* inducen apoptosis en diferentes tipos celulares (18). Por lo que, podríamos sugerir que si bien p30 no induce NETs, podría inducir apotosis de neutrófilos, aunque esto debe ser comprobado.

Además, en este trabajo, observamos un mayor número de NETs al estimular a los neutrófilos con la p30 de *S. typhimurium* combinada con suero de pacientes con EA que con suero de sujetos sanos.

Se ha reportado que en el suero de pacientes con EA presenta niveles más altos de anticuerpos anti-p30, comparado con los niveles encontrados en los sueros de sujetos control (10). Por lo que al poner en contacto la p30 con el suero de pacientes con EA podrían formarse inmunocomplejos que serían reconocidos por los neutrófilos a través de sus FcγRs e inducir la producción de NETs.

**8. CONCLUSIÓN**

La p30 *S. typhimurium* no induce la liberación de NETs. Sin embargo, el suero de pacientes con EA, contienen anticuerpos que interaccionan con la p30 *S. typhimurium* y debido a esa interacción podrían formarse inmunocomplejos con la capacidad de formar trampas extracelulares de neutrófilos.

**9. BIBLIOGRAFÍA**

1. Triana-Santillan J, Escala-Maccaferri A, Diaz-Peña J, Miño-Garzon A, Davila-Quijano J. Ankylosing spondylitis. A case report. Revista Médica 2010.
2. González-Rodríguez M, Guerra-Soto A, Corona-Sánchez E, Rocha-Muñoz A, Díaz-González E, González-López E. (2013). Espondilitis anquilosante. Conceptos genrales. 2017.
3. Castro-Santos P, Gutiérrez MA, Díaz-Peña R Genetics of ankylosing spondylitis Rev. méd. Chile vol.142 no.9 Santiago set. 2014.
4. Carpeta S, Mantilla R, Iglesias A, Ossa H. HLA B27 Y Espondilitis Anquilosante: Estudio De Asociación En La Población Colombiana Universidad Distrital.
5. Durán-Avelar MdJ, Vibanco-Pérez N, Rodríguez-Ocampo AN, Agraz-Cibrian JM, Peña-Virgen S, Zambrano-Zaragoza JF. Humoral Immune Response to Salmonella Antigens and Polymorphisms in Receptors for the Fc of IgG in Patients with Ankylosing Spondylitis. Clinical and Molecular Advances in Ankylosing Spondylitis Intech. 2012.
6. Guilabert Vidal A. Polimorfismos del receptor Fc gamma en patología cutánea inmunomediada: Papel en la patogenia del penfigoide ampolloso y en la respuesta a tratamiento biológico en la psoriasis. 2012.
7. Pérez-Rodríguez M. HLA y enfermedad. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2005; 43 (Supl 1): 91-93
8. Jeffrey A. Sparks, MD, MMSc1 and Karen H. Costenbader, MD, MPH. (Noviembre 2014). Genetics, environment, and gene-environment interactions in the development of systemic rheumatic diseases.
9. Durán-Avelar MJ, Vibanco-Pérez N, Rodríguez-Ocampo AN, Peña-Virgen S, Zambrano-Zaragoza JF. Lymphoproliferative response to the 30-kDa protein and a crude lysate from Salmonella typhimurium in patients with ankylosing spondylitis. Scand J Rheumatol. 2013;42(3):232–4.
10. Zambrano-Zaragoza JF, de Jesus Durán-Avelar M, Rodríguez-Ocampo AN, García-Latorre E, Burgos-Vargas R, Dominguez-Lopez M-L, et al. The 30-kDa band from Salmonella typhimurium: IgM, IgA and IgG antibody response in patients with ankylosing spondylitis. Rheumatology (Oxford). 2009;48(7):748–54
11. Thomas J. Kindt, Richard A. GoldsbyBarbara A. Osborne. Inmunología de Kuby 2007. Mcgraw-Hill Interamericana editores, S.A. de C.V.
12. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracelular traps: Is inmunity the second función of choromatin? 2012.
13. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004;303(5663):1532–5.
14. [J.-Kaplan M,](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kaplan%20MJ%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22956760)  [Radic](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Radic%20M%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22956760)M. Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-Edged swords of innate immunity. [J Immunol. 2012; 189 (6): 2689-2695.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&retmode=ref&cmd=prlinks&id=22956760)
15. Gabelloni ML, Sabbione F, Lula L, Keitelman I, Jancic C, Giordano M, Geffner J, Trevani A. Trampas extracelulares de neutrófilos: una novedosa estrategia antiinfecciosa empleando moléculas antimicrobianas largamente conocidas. Revista QuímicaViva 2013.
16. Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán M, Iñiguez-Gutierrez L, García-Orozco A, Alvarado-Navarro A and Fafutis-Morris M. 2017; Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. Frontiers in Immunology.
17. Arango J, Gamez L, Lopez J. Sistema NADPH oxidasa: nuevos retos y perspectivas. Revista scielo.. vol.23 no.4 Medellín Oct./Dec. 2010.
18. Manriquez X, Lopez Y, Gutiérrez P. Inducción de apoptosis por especies del género Mycobacterium. Revista Latinoamericana de Microbiologia. Vol 50. 2008