



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 349 030**

51 Int. Cl.:

A61K 31/495 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61K 31/635 (2006.01)

A61K 31/65 (2006.01)

A61K 31/702 (2006.01)

A61K 31/7036 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02730515 .0**

96 Fecha de presentación : **17.06.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1401448**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2004**

54 Título: **Tratamiento antibacteriano de la osteoartritis.**

30 Prioridad: **15.06.2001 GB 0114672**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.12.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.12.2010

73 Titular/es: **Orthogenics AS.**
Alvevegen 228
9016 Tromsoe, NO

72 Inventor/es: **El-Gewely, Mohamed, Raafat**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 349 030 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

El presente invento se refiere a la osteoartritis y a métodos para el tratamiento y el diagnóstico de la misma.

La osteoartritis (OA) es también conocida como "enfermedad degenerativa de las articulaciones" y es el tipo más común de artritis, estimándose que solamente en los Estados Unidos de América afecta a 20,7 millones de adultos (datos de www.nih.gov/niams/healthinfo/artrheu.htm). La osteoartritis afecta principalmente al cartílago, el tejido que protege los extremos de los huesos en una articulación. Tiene lugar una osteoartritis cuando el cartílago comienza a deteriorarse, desgastarse y descomponerse. En casos extremos, el cartílago puede consumirse hasta dejar una articulación de hueso sobre hueso. La osteoartritis puede causar dolor articular, movilidad articular reducida e incapacidad. Resulta muy a menudo una incapacidad cuando la enfermedad afecta a la columna vertebral y a las articulaciones que soportan peso (las rodillas y las caderas).

Típicamente, los síntomas de la OA se desarrollan bastante lentamente. Una articulación concreta puede doler o producir molestias después de un uso prolongado o después de un periodo de inactividad, tal como, por ejemplo, tras dormir. El dolor, la rigidez y la molestia empeorarán generalmente con el tiempo, y la amplitud de movimientos de la articulación puede llegar a reducirse. Un sonido chirriante al moverse indica que el cartílago de la articulación se ha desgastado y que los huesos están rozando uno contra otro.

La osteoartritis es conocida como "artritis degenerativa" y puede afectar a la rodilla, la cadera, la columna vertebral y otras estructuras; es el más común de todos los trastornos articulares humanos. La OA es clasificada como una artritis no inflamatoria y, por lo tanto, puede distinguirse de enfermedades reumáticas como la artritis reumatoide, que es clasificada como una artritis inflamatoria. La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria del revestimiento de la articulación (sinovia), y se asocia con hinchazón e inflamación de ciertas articulaciones, dolor muscular y finalmente la pérdida de uso de la articulación en su conjunto. La inflamación tiende a ser simétrica, lo que facilita el diagnóstico de la artritis reumatoide. Otras enfermedades del grupo de las enfermedades reumáticas incluyen la gota, que afecta muy comúnmente al dedo gordo del pie y se desarrolla rápidamente, la artritis infecciosa, que es una expresión general usada para describir las diversas formas de artritis causadas por agentes infecciosos tales como bacterias y virus, y la artritis reactiva, que se desarrolla después de una infección que afecta al tracto urinario, el intestino y otros órganos y se asocia a menudo con problemas oculares, erupciones cutáneas y úlceras

bucales.

El término "artritis" se utiliza a veces para referirse a todas las enfermedades reumáticas; sin embargo, la palabra significa literalmente inflamación articular, es decir, hinchazón, enrojecimiento, ardor y dolor causados por una lesión o enfermedad tisular en la articulación. Los diferentes tipos de artritis comprenden sólo una parte de las enfermedades reumáticas que también incluye enfermedades descritas como "enfermedades del tejido conjuntivo" y enfermedades autoinmunes tales como fibromialgia y lupus eritematoso sistémico. Como se discutió anteriormente, la OA ya no se ve como parte de este grupo puesto que es una artritis no inflamatoria.

No se conoce la causa de la OA, pero se cree que es el resultado de una combinación de factores. Se ha pensado que una edad avanzada, una historia familiar de la enfermedad, un uso excesivo o abuso de una articulación concreta, una lesión, la existencia de sobrepeso y otras enfermedades pueden contribuir al desarrollo de la OA. La causa o las causas de los tipos de artritis infecciosa (bacterias y virus) y la gota (cristales de ácido úrico en la articulación) son mejor comprendidas por los científicos y los médicos.

Se han investigado el papel de ciertas enzimas, endógenamente producidas, en la descomposición del cartílago articular en la OA y la posibilidad de utilizar fármacos que bloqueen la acción de estas enzimas. En particular, se libera espontáneamente óxido nítrico, que es producido por una familia de enzimas llamadas óxido nítrico sintasas, del cartílago humano afectado por OA en cantidades suficientes para causar daño en el cartílago. Está la hipótesis de que el NO inhibe la producción de matriz al interferir en importantes factores autocrinos y paracrinos, y se ha mostrado que el NO inhibe la producción de TGF- β . Los condrocitos articulares activados producen grandes cantidades de NO, y existe la creciente evidencia de que esto podría estar implicado en la etiopatogénesis de la osteoartritis. Es probable que los efectos biológicos del NO endógenamente producido, a causa de su corta semivida, se produzcan localmente dentro del cartílago (R. Studer, Osteoarthritis and Cartilage, Volumen 7, Número 4, Julio de 1999). Además, un componente importante del cartílago es el colágeno de tipo II, que es degradado por la gelatinasa, una metaloproteinasa endógena.

El diagnóstico de enfermedades reumáticas o la OA puede ser difícil porque ciertos síntomas son comunes a muchas enfermedades diferentes. El diagnóstico puede requerir la remisión a un reumatólogo ya que, incluso si se ha realizado el diagnóstico de una de las enfermedades reumáticas, puede ser necesario que un es-

pecialista determine cuál.

Típicamente, el diagnóstico requerirá una revisión completa de la historia médica del paciente, incluyendo la historia familiar, un examen físico, pruebas de laboratorio, y rayos X u otras técnicas con formación de imágenes. El examen físico
5 incluirá típicamente la investigación de todas las articulaciones en cuanto a enrojecimiento, ardor, deformidad, facilidad de movimiento y sensibilidad. Puesto que ciertas formas de artritis, tal como el lupus, pueden afectar a otros órganos, puede resultar necesario un examen físico completo que incluya el corazón, los pulmones, el abdomen, el sistema nervioso, los ojos, los oídos y la garganta. Puede ser necesario llevar
10 a cabo en sangre, orina y/o líquido sinovial una de diversas pruebas de laboratorio que incluyen: para anticuerpos antinucleares, recuento sanguíneo completo, hematocrito, para factor reumatoide, y urinálisis.

Puede que el médico necesite ver al paciente más de una vez con objeto de hacer el diagnóstico, y la decisión final será generalmente un diagnóstico de trabajo basado en un número de parámetros diferentes, que se basa en la competencia y la correspondiente experiencia del facultativo que realiza el examen. Una prueba menos subjetiva para la OA que fuera rápida y fácil de llevar a cabo mejoraría en gran medida el proceso diagnóstico. Puesto que la OA es común, sería útil para identificar positivamente la OA pero, igualmente, si se pudiera descartar la OA en una fase temprana, esto también sería considerablemente provechoso para el facultativo.
20

Hasta ahora, en cuanto a tratamientos actualmente disponibles para la OA, no hay un único tratamiento exitoso disponible para todos los pacientes. En un plan de tratamiento típico se combinan normalmente varios tipos de tratamiento dependiendo de la fase y la gravedad del estado y de las necesidades médicas y de estilo de vida del paciente. Los tratamientos pueden incluir descanso y relajación, ejercicio, cambios en la dieta y medicación; en casos graves, puede ser necesaria la cirugía.
25

Se admite generalmente (www.nih.gov/niams/healthinfo/artrheu.htm) que las medicaciones disponibles usadas para tratar la mayoría de las enfermedades reumáticas y la OA no proporcionan una cura sino que, más bien, limitan los síntomas de la enfermedad. Aunque la artritis infecciosa (por ejemplo, la enfermedad de Lyme), si se diagnostica a tiempo, puede ser exitosamente tratada con antibióticos.
30

Las medicaciones comúnmente utilizadas para tratar la OA proporcionan un alivio del dolor. Los analgésicos adecuados incluyen la aspirina y otros fármacos antiinflamatorios no esteroides (NSAIDs; del inglés, non-steroidal anti-inflammatory drugs), tal como el ibuprofeno (que tienen la ventaja añadida de disminuir la inflama-
35

ción asociada con el daño tisular). En los últimos años, los cambios tempranos en las articulaciones han sido quirúrgicamente tratados utilizando una combinación de células de cartílago cultivadas y cubierta perióstica del paciente, en un intento para reparar el cartílago dañado. Sólo un pequeño número de pacientes puede ser tratado mediante este método caro e invasivo.

Se ha planteado la hipótesis [A. R. Amin et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, páginas 14.014-14.019] de que se podrían usar tetraciclinas en el tratamiento de la OA a causa de su capacidad para inhibir la expresión de la óxido nítrico sintasa (NOS; del inglés, nitric oxide synthase) endógena. La posibilidad de utilizar la tetraciclina doxiciclina en el tratamiento de la OA a causa de su capacidad para inhibir la actividad colagenasa del paciente fue discutida por L. P. Yu et al. (1991) en J. Rheumatol. 18, páginas 1450-2. Aún no se ha lanzado al mercado un producto basado en estos compuestos.

De la discusión anterior resulta evidente que los métodos existentes para el diagnóstico y el tratamiento de la OA no son completamente satisfactorios. Dado el número de pacientes aquejados de OA, particularmente en las poblaciones occidentales envejecidas, existe la necesidad real de un diagnóstico rápido y fiable de la OA y de tratamientos mejorados para la misma. Siguiendo un nuevo y sorprendente descubrimiento, el presente invento proporciona una enseñanza que aborda estos dos problemas.

El presente inventor ha establecido, por vez primera, un vínculo entre bacterias y osteoartritis. Nunca se había sugerido antes que las bacterias pudieran ejercer un papel principal en la OA, y la identificación de este papel abre la posibilidad de una diversidad de nuevas técnicas terapéuticas y diagnósticas en el campo del cuidado de los aquejados de OA. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto, el presente invento proporciona el uso de un agente antibacteriano en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la OA bacteriana primaria, mediante el tratamiento de una infección bacteriana que es responsable de la OA. Alternativamente expresado, el presente invento proporciona un agente antibacteriano para uso en el tratamiento de una OA bacteriana primaria, mediante el tratamiento de una infección bacteriana que es responsable de la OA.

Los síntomas y el diagnóstico de la OA se discutieron anteriormente y, aunque puede ser un proceso complejo, un facultativo adecuadamente experimentado normalmente puede diagnosticar exitosamente la OA. Una definición útil de la OA para los fines del presente invento es la siguiente: dolor en una o más articulaciones, des-

gaste gradual del cartílago de esa articulación (típicamente durante varios años), más ausencia de síntomas de cambios artríticos como los que se hallan, por ejemplo, en la artritis reumatoide.

Los cambios típicos hallados en las radiografías de pacientes con OA incluyen un espacio articular estrecho y esclerosis subcondral. La OA se caracteriza por dolor y pérdida de función de la articulación causadas por una pérdida generalmente progresiva de cartílago articular, lo que va seguido de un intento de reparación del cartílago articular y también de remodelación y esclerosis del hueso subcondral. También se pueden hallar osteofitos y quistes en el hueso subcondral y sinovitis secundaria dentro de la articulación. Por contraste con las enfermedades reumáticas, la inflamación no es un aspecto principal de la enfermedad.

La OA se puede dividir en OAs primaria y secundaria. La OA primaria es la forma más común y aparece con incidencia creciente al aumentar la edad; actualmente no hay cura disponible. El American College of Rheumatology (ACR), <http://www.rheumatology.org/patients/factsheets.html>, proporciona la siguiente definición de OA primaria: La OA es un grupo heterogéneo de estados que conducen a síntomas y signos articulares que están asociados con una integridad defectuosa del cartílago articular, además de cambios relacionados en el hueso subyacente y los bordes de la articulación. El diagnóstico implicará típicamente la evaluación de aspectos patológicos, radiográficos y clínicos.

La OA secundaria es menos común, y sus causas incluyen anormalidades metabólicas, genéticas y de desarrollo del cartílago articular. En la OA secundaria, se reconoce un claro estado, proceso o enfermedad causal. A menudo se presenta OA secundaria en las circunstancias siguientes: síndrome de Stickler (artro-oftalmopatía hereditaria progresiva), hemocromatosis, enfermedad por depósitos de pirofosfato de calcio, lesión en la superficie articular, inestabilidad de las articulaciones, incongruencia de las articulaciones, denervación (articulación de Charcot), displasias epifisarias, tras artritis séptica (infección), osteonecrosis, osteocondritis disecante, y años después de daño en el menisco y/o extirpación del menisco.

En realidad, los datos aquí presentados en relación con el papel de una infección bacteriana en el desarrollo de la OA podrían conducir a su clasificación como un estado secundario que resulta de una infección bacteriana inicial.

Los inventores son los primeros en identificar un papel primario (es decir, causal) de las bacterias en la OA; es decir, una infección puede ser un proceso primario o ser secundaria a un proceso de iniciación en la OA pero, no obstante, es

responsable de uno o más (típicamente la mayoría o todos) de los síntomas característicos de la OA y/o de exacerbar dichos síntomas. Por lo tanto, la expresión "responsable de" debería ser interpretada teniendo en cuenta esta relación.

5 Los datos clínicos aquí presentados en relación con el tratamiento de pacientes osteoartrosicos con un antibiótico confirman los datos moleculares y demuestran un papel de las bacterias en la osteoartritis. Se consideró que la mayoría de los pacientes examinados mostraban síntomas mejorados después de sólo 4 semanas de tratamiento con un antibiótico.

10 Aún sin pretender el respaldo de la teoría, parece probable que puede haber cierto daño inicial en el cartilago y que la infección causativa de la OA se transmite a través del líquido sinovial o a través de los vasos sanguíneos desarrollados alrededor del cartilago lesionado. Este papel activo de las bacterias en el desarrollo de la OA puede ser contrastado con las infecciones bacterianas secundarias que pueden tener lugar, por ejemplo, después de una cirugía y que no son en sí responsables de los síntomas de la OA.

15 Por ejemplo, se han descrito previamente antibióticos en un contexto profiláctico [B. Espehaug et al. (1997), J. Bone Joint Surg. Br., Julio; 79 (4), páginas 590-5]. En este estudio, se administraron antibióticos sistémicos y/o cemento que contenía antibióticos a pacientes osteoartrosicos que acababan de recibir reemplazos de cadera totales cementados primarios. Implantar un metal durante el tratamiento de fracturas o la OA significa aumentar el riesgo de infección ya que las bacterias pueden atravesar fácilmente la zona alrededor de un implante metálico. Sin embargo, el uso de antibióticos en este contexto no es para el tratamiento de una infección bacteriana que tiene un papel causal en la propia OA. Por contraste, de acuerdo con el presente invento, el tratamiento es típicamente no profiláctico; es decir, se trata una infección establecida que es responsable de la OA observada. Además, las bacterias concretas que pueden causar problemas después de una operación son diferentes de las ahora identificadas por tener un papel causal en la OA y sus síntomas.

20 El presente invento puede ser también distinguido de publicaciones tales como la de Amin et al. (supra), que sugieren un posible papel de las tetraciclinas en el tratamiento de la OA por medio de la capacidad de dichas moléculas para inhibir enzimas endógenas que incluyen NOS y colagenasa. Evidentemente, dichos documentos no tienen relación con, y no describen, el uso de tetraciclinas en el tratamiento de una infección bacteriana, siendo la actividad antibiótica secundaria a las actividades de interés. En estos documentos no se sugiere un papel causal de bacterias en la OA.

Los inventores han sido capaces de establecer el vínculo entre bacterias y OA a través de una serie de experimentos. No se habían encontrado previamente bacterias en las articulaciones con osteoartritis primaria (excepto en casos con cirugía de intercambio después de aflojamiento). Como se discutió anteriormente, la artritis séptica (infecciosa) es un estado diferente, y en dichas articulaciones se encuentran normalmente bacterias tales como estreptococos y estafilococos y algunas especies Gram negativas. Sólo una combinación fortuita de técnicas, es decir, el modo de tomar biopsias, métodos de presentación diferencial modificados y finalmente el análisis de rRNA 16s alertó a los inventores de la posibilidad de una implicación bacteriana, lo que luego se confirmó. Se presenta la hipótesis de que la presencia de bacterias puede haber estado "oculta" en el pasado porque es difícil desarrollar las bacterias pertinentes en ensayos de cultivo estándares.

Todos los pacientes incluidos en el grupo "osteoartrítico" pasaron por procedimientos de artroplastia en una rodilla. Se tomaron las biopsias durante la cirugía, cuando la articulación estaba siendo reemplazada tanto en el lado femoral como en el tibial. El diagnóstico de la osteoartritis se basaba en dolor en la articulación, un típico desgaste gradual del cartílago durante años, falta de signos de cambios artríticos como los hallados en la artritis reumatoide, y los típicos cambios hallados en radiografías, tales como espacio articular estrecho y esclerosis subcondral. Los cambios patológicos estaban muy avanzados; esto viene respaldado por la necesidad de los pacientes a someterse a una artroplastia de la articulación.

Uno de los grupos testigo incluidos eran pacientes con cartílago normal, de los cuales se tomaron muestras durante el reemplazo del ligamento cruzado anterior. Ningún trauma reciente había alterado las rodillas sometidas a esta operación, y el trozo de cartílago estudiado hubo de ser extirpado durante el procedimiento de reemplazo para permitir el espacio suficiente para que funcionara el ligamento reparado. Se halló que ninguno de estos pacientes testigo tenía la secuencia génica bacteriana a identificar.

En el otro grupo testigo, los pacientes sólo tenían zonas dañadas localizadas, sin daño general en la articulación. Todos fueron operados en un intento para recuperar la arquitectura y las funciones de un cartílago normal. Esta operación incluía el uso de condrocitos cultivados in vitro, la extirpación del cartílago dañado y el cubrimiento de la zona a reparar con periostio y las células cultivadas in vitro. Se halló que ninguno de los pacientes con este daño limitado del cartílago tenía el gen bacteriano. Estos resultados sugieren que en las primerísimas fases del desarrollo de la OA puede

haber poca o ninguna implicación bacteriana pero que una infección bacteriana es responsable del desarrollo de la verdadera OA y de los síntomas avanzados y más graves de la misma. Es el progreso hasta la OA verdadera (fase avanzada) en una articulación dada el responsable del dolor y la falta de movilidad experimentados por la mayoría de los pacientes con OA, y, por lo tanto, serían deseables tratamientos que evitaran o lentificaran este progreso.

Los síntomas característicos de la OA de primera fase incluyen dolor durante la actividad y un nivel reducido de actividad. En una fase avanzada de la OA, se puede observar dolor durante el descanso y por la noche, así como durante la actividad. Se reduce mucho la actividad y es común el uso de muletas. También se asocian con la OA avanzada un movimiento reducido de la articulación y rigidez en la articulación.

Desde el punto de vista del médico, en las primeras fases de la OA se halla dolor en la línea articular y puede haber un líquido sinovial aumentado en la articulación. Las radiografías indican generalmente un estrechamiento del espacio articular porque el cartílago está reducido. Sin embargo, los barridos con formación de imágenes por resonancia magnética son más útiles que las imágenes por rayos X en las primeras fases ya que permiten identificar cambios tempranos en el cartílago y el hueso subcondral. Una artroscopia puede revelar fibrilación, grietas y defectos en el cartílago. En la OA avanzada, hay dolor aumentado en la línea articular, palpación de osteofitos y normalmente líquido sinovial aumentado. Las radiografías revelan un estrechamiento significativo del espacio articular hasta la articulación, donde aparece como hueso contra hueso sin espacio para cartílago. Los rayos X también revelan esclerosis y quistes en el hueso subcondral, posible deformación de la articulación y normalmente osteofitos alrededor de los bordes de la articulación. La artroscopia revela cartílago ausente y degradado.

También se describe aquí el uso de un agente antibacteriano en la fabricación de un medicamento para prevenir o reducir el desarrollo de, o el progreso hasta, una osteoartritis de fase avanzada. Si se diagnostica la OA en una fase muy temprana, puede ser apropiado entonces un tratamiento profiláctico con un antibiótico.

Se utilizó una técnica modificada de presentación diferencial, que aquí se describe con detalle en la sección "Ejemplos". La presentación diferencial es un método que se utiliza para descubrir genes que se expresan diferencialmente en una situación con respecto a otra. Se realiza la transcripción inversa de mRNA y, de la población de cDNA, se multiplica un número pequeño de genes utilizando cebadores

seleccionados y PCR. La separación de las muestras bajo investigación (multiplicadas con los mismos conjuntos de cebadores) una al lado de la otra en un gel de alta resolución produce un patrón de bandas, cada una de las cuales representa un gen expresado de las muestras originales. Se dice que un gen/banda que se encuentra en una muestra pero no en otra se expresa diferencialmente.

En este caso, se tomaron biopsias de la rodilla, de la parte osteoartítica del cartílago de pacientes con OA y de otro paciente durante la reparación del ligamento cruzado. En un paciente con OA, se compararon las biopsias de la zona osteoartítica con las de una zona no alterada. Hubo un problema con mRNA insuficiente en la muestra de cartílago. El tejido cartilaginoso está compuesto de células condrocíticas rodeadas por matriz extracelular. El número total de células por gramo de tejido es pequeño. La matriz extracelular consiste esencialmente en colágeno (tipos II, IX, XI), proteoglicanos (agrecano) y otras moléculas grandes, tal como hialuronano. La extracción de mRNA de pequeñas muestras de cartílago produce niveles casi indetectables de mRNA. Esto se debe tanto al pequeño número de células en un pequeño trozo de tejido con pocas células por unidad de peso, como al efecto de la matriz extracelular sobre la eficacia de las extracciones/aislamiento de mRNA. Los proteoglicanos se unen fácilmente al RNA y, por lo tanto, reducen el rendimiento. Por consiguiente, se multiplicó la población completa de cDNA como una operación preliminar después de la transcripción inversa.

Las bandas diferencialmente expresadas del gel pueden ser cortadas, remultiplicadas, clonadas y luego secuenciadas. Este trabajo permitió identificar a la NOS como la más expresada en el cartílago osteoartítico, y el análisis secuencial indicó que el gen tenía mayor homología con una secuencia bacteriana que con una secuencia humana. La presencia de bacterias fue luego confirmada al detectar rRNA 16S en tejidos osteoartíticos, lo que es indicativo de bacterias patógenas en el tejido cartilaginoso afectado.

Una secuenciación y unos estudios comparativos ulteriores del rRNA 16S ha permitido la identificación de la especie bacteriana implicada en la OA, y esto permitirá la selección de los antibióticos más apropiados. La especie implicada es, o está muy estrechamente relacionada con, *Janthinobacterium Duganella* es un ejemplo de una especie muy estrechamente relacionada con *Janthinobacterium*. Los datos secuenciales indican que la bacteria responsable está relacionada con subespecies de *Pseudomonas*. Dichas bacterias son diferentes de las bacterias que causan problemas en los hospitales a causa de la infección de heridas y zonas quirúrgicas. Puede haber

una población bacteriana heterogénea que cause OA en la(s) articulación(es) de ciertos pacientes.

Por "agente antibacteriano" se quiere significar cualquier compuesto o formulación que mata bacterias, previene o inhibe la proliferación de bacterias o, si no, debilita o incapacita bacterias. Se pueden utilizar agentes tanto bactericidas como bacteriostáticos. El agente puede tener una actividad específica para una sola especie bacteriana o para un pequeño número de especies bacterianas, o puede ser activo frente a una gran variedad de bacterias, tal como los péptidos que afectan a las membranas bacterianas.

Los agentes antibacterianos adecuados pueden ser usados localmente o ser administrados intravenosa u oralmente. El tratamiento podría incluir uno o más de los puntos siguientes:

- a - Una pequeña operación con artroscopia que incluirá limpiar la articulación e inyectar el antibiótico seleccionado, o una artrotomía con una aguja que inyecta el antibiótico seleccionado.
- b - De nuevo mediante artroscopia, poner en las articulaciones afectadas una matriz que libera antibiótico.
- c - Administración oral de una combinación de antibióticos seleccionados.
- d - Administración intravenosa de una combinación de antibióticos seleccionados.

Además, la prótesis o las células podrían ser impregnadas o formuladas con antibióticos antes de la implantación.

Se conocen muchos agentes antibacterianos y se están desarrollando más en todo momento. Los agentes antibacterianos preferidos son aquellos que son eficaces en el tratamiento de infecciones por *Pseudomonas*. Se prefieren los antibióticos que son activos incluso contra especies bacterianas que tienen tendencia a formar biopelículas por percepción de quórum, ya que *Pseudomonas*, *Janthinobacterium* y *Burkholderia* tienen una elevada tendencia a formar dichas biopelículas. De esta manera, una clase preferida de antibióticos es la de aquellos que se dirigen a/contra los genes o productos génicos implicados en la percepción de quórum y la formación de biopelículas.

En realidad, se ha mostrado recientemente que un componente principal de las biopelículas producidas por *Pseudomonas* es DNA (se cree que las bacterias responsables de la osteoartritis son similares a la *Pseudomonas*). Por lo tanto, en una realización preferida del presente invento, el tratamiento será una terapia combinada en que se administran conjuntamente un antibiótico y un agente que puede rom-

per el DNA, preferiblemente una enzima, tal como, por ejemplo, una enzima de restricción o DNasa I. Se produce un efecto sinérgico ya que la enzima o el otro agente rompe el DNA y reduce la viscosidad de la biopelícula, lo que permite una penetración más eficaz del antibiótico. En la articulación afectada se inyectarán preferiblemente
5 agentes anti-DNA, tal como DNasa I.

Los compuestos siguientes son ejemplos específicos de agentes antibacterianos adecuados: combinación de claritromicina/levofloxacina, mercaptoetilguanidina (se ha hallado que inhibe la respuesta inflamatoria debida al ácido nítrico en una infección por *Pseudomonas*), lactato de ciprofloxacina (eficaz frente a *Pseudomonas*),
10 tobramicina (se ha usado contra *Pseudomonas*), ceftazidima pentahidratada (sola o en combinación con otros antibióticos), gentamicina (se usa localmente en cirugía ortopédica para el tratamiento de infecciones y podría utilizarse en el tratamiento local de la osteoartritis), ciproxina, rifampicina (en combinación con ceftazidima pentahidratada y/o gentamicina), doxiciclina (un antibiótico de amplio espectro) y trimetoprima/sulfametoxazol (combinación).
15

En ciertos casos, por ejemplo cuando hay preocupación acerca de los efectos secundarios que siguen a un tratamiento sistémico, el agente antibacteriano será preferiblemente inyectado en (o cerca de) la articulación osteoartítica afectada. Los agentes antibacterianos de esta categoría incluyen gentamicina y ciproxina. De acuerdo con un régimen de tratamiento preferido, se administrarán conjuntamente 2 o
20 más agentes antibacterianos, tales como, por ejemplo, gentamicina y doxiciclina. En este caso, se puede administrar oralmente un agente activo e inyectar el otro localmente.

Los agentes de realización particularmente preferidos son aquellos que son eficaces contra *Janthinobacterium* y/o *Pseudomonas* o bacterias de tipo *Pseudomonas*.
25

Durante el trabajo que condujo al presente invento, los inventores mostraron que la óxido nítrico sintasa (que parecía ser de origen bacteriano) se expresaba diferencialmente en tejidos con OA. Se ha hallado que la óxido nítrico sintasa resulta
30 inhibida incluso a nivel transcripcional por compuestos de tetraciclina, y, por lo tanto, dichos compuestos son una clase preferida de antibióticos para uso en el invento.

Los agentes antibacterianos para uso de acuerdo con el presente invento tienen tal efecto suficientemente inhibitor sobre las bacterias de la articulación que causan una mejoría mensurable y significativa de la osteoartritis y sus síntomas asociados. No se espera que el tratamiento sea totalmente exitoso en todos los casos
35

pero el "tratamiento" de acuerdo con el presente invento debería incluir una mejoría en una o más de las áreas siguientes: dolor en, y alrededor de, la articulación en reposo o en movimiento, inflamación alrededor de la articulación, movimiento de la articulación y deterioro del cartílago de la articulación. El tratamiento se verá preferiblemente como una mejoría en una o más de estas áreas, pero puede incluir la prevención o lentificación de la ulterior decadencia del cartílago, el movimiento de la articulación, etc. La naturaleza de la OA significa que si se detiene el desarrollo de la enfermedad podría haber un beneficio significativo para el paciente. Si se pretende introducir tejido creado o nuevas células en el sitio del daño en la articulación, el sitio es entonces preferiblemente tratado en primer lugar con un agente antibacteriano de acuerdo con la enseñanza del invento.

Para el tratamiento de acuerdo con el presente invento, se pueden tener en cuenta todos los pacientes con OA bacteriana primaria, estén recién diagnosticados o estén en una fase más avanzada. Los síntomas en que se puede observar una mejoría se discutieron anteriormente.

Se puede determinar una cantidad "farmacéuticamente eficaz" en relación con las diversas áreas aquí discutidas en que el tratamiento puede proporcionar mejorías mensurables, y se puede seleccionar con referencia a los Ejemplos.

También se describe un método para mejorar la movilidad articular y/o reducir el dolor y/o la inflamación de una articulación en un mamífero, método que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente antibacteriano a dicho mamífero.

La mejoría en la movilidad articular puede ser valorada por el propio paciente o por su asesor médico; lo mismo en cuanto al dolor y la inflamación.

También se describe una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la OA bacteriana primaria, más particularmente de una infección bacteriana responsable de la OA, composición que comprende un agente antibacteriano junto con al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En dichas composiciones, el ingrediente activo puede comprender del 0,05% al 99% en peso de la formulación, más preferiblemente del 0,1% al 5,0%.

Por "farmacéuticamente aceptable" se quiere significar que los ingredientes deben ser compatibles con otros ingredientes de la composición, así como fisiológicamente aceptables para el receptor.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas de acuerdo con cualquiera de los métodos convencionales conocidos en la técnica y ampliamente

descritos en la bibliografía. De esta manera, el ingrediente activo puede ser incorporado, opcionalmente junto con otras sustancias activas, con uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes convencionales para producir preparaciones galénicas convencionales tales como tabletas, píldoras, polvos, pastillas, sobres, cápsulas, elixires, suspensiones, emulsiones, disoluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), ungüentos, cápsulas de gelatinas blanda y dura, supositorios, disoluciones inyectables estériles, polvos envasados estériles, y similares. Anteriormente se discutieron otros métodos para formular los agentes antibacterianos, por ejemplo, mediante su incorporación a dispositivos para implantación.

10 Los agentes activos se formulan preferiblemente en tabletas, conteniendo cada tableta una cantidad predeterminada de ingrediente activo. Como aquí se discute, puede ser deseable inyectar ciertos antibióticos en la articulación afectada.

Las dosis adecuadas variarán de paciente a paciente y pueden ser determinadas por el médico de acuerdo con el peso, la edad y el sexo del paciente y la gravedad del estado, y también con el particular agente antibacteriano seleccionado. Una dosis diaria total típica de agente antibacteriano estará en la región de 50-1000 mg, preferiblemente de 100-300 mg. Esto se administrará preferiblemente como una sola dosis.

20 Las mejorías en los pacientes tratados de acuerdo con el presente invento pueden verse a lo largo de una semana o dos y, normalmente, el tratamiento se debería continuar durante 1 a 2 meses o más para alcanzar los beneficios máximos. Como aquí se muestra, puede que 4 semanas sean suficientes para ver mejorías significativas.

25 La identificación de un papel de las bacterias en el desarrollo de la OA también proporciona nuevos métodos para el diagnóstico exacto de la OA. Se pueden examinar biopsias tomadas de pacientes de los que se sospecha que tienen OA, por ejemplo, muestras de líquido sinovial, en cuanto a la presencia de bacterias patógenas. De esta manera, en un aspecto más, el presente invento proporciona un método *in vitro* para diagnosticar osteoartritis en un paciente del que se sospecha que tiene osteoartritis, método que comprende examinar una muestra de una articulación de dicho paciente en cuanto a la presencia de bacterias (patógenas) que confirmen que dicha articulación está afectada por osteoartritis bacteriana primaria.

30 Un método particularmente preferido implica el uso de cebadores o sondas de ácido nucleico diseñados para detectar la especie bacteriana de interés por medio de homología con una región (secuencia) diana del ácido nucleico de las bacte-

rias. Aquí se describen cebadores adecuados en los Ejemplos. Preferiblemente, el cebador o los cebadores se dirigen a una región del rRNA 16S (o el gen que lo codifica). Los cebadores aquí diseñados como F21- y R21-, particularmente F21-4 y R21-4, son específicos para secuencias de tipo *Janthinobacterium* y son especialmente preferidos. También es particularmente adecuada la pareja de cebadores F21-2 y R21-4.

Las sondas/cebadores tienen homología con secuencias diana; es decir, son capaces de unirse con secuencias diana bajo niveles de rigor estándares.

En los Ejemplos presentes se proporcionan métodos para obtener muestras adecuadas de pacientes de los que se sospecha que tienen OA en una o más articulaciones. El método diagnóstico aquí descrito proporciona una prueba útil y fiable para confirmar que una articulación está afectada por OA bacteriana primaria y se puede utilizar solo o junto con técnicas diagnósticas conocidas.

La muestra examinada será preferiblemente líquido sinovial. Si sólo se obtiene un poco de líquido, se puede inyectar entonces disolución salina (posiblemente hasta aproximadamente 30 ml) antes de una aspiración ulterior. Estas muestras fluidas pueden ser luego centrifugadas para obtener una muestra de células; por ejemplo, centrifugando a 13.000 rpm (15.000g) durante 45 minutos. Las células del sedimento de centrifugación son preferiblemente lavadas 2-3 veces con una disolución salina estéril antes de ser congeladas a, por ejemplo, -70 °C.

El ensayo para el marcador génico bacteriano se puede basar en la identificación de RNA (por ejemplo, directamente para rRNA 16S) o DNA (por ejemplo, el gen que codifica rRNA 16S). Cuando se analiza RNA, antes de que se pueda llevar a cabo una PCR, se requiere una operación de transcripción inversa para generar cDNA. En los Ejemplos se describen métodos para analizar RNA, pero en su lugar/también se puede analizar el DNA de las bacterias del líquido sinovial. Se puede aislar primero el DNA de las células usando, por ejemplo, el kit tisular DNeasy de QIAGEN (número 69504 del catálogo). Alternativamente, el DNA puede ser multiplicado y analizado sin una operación de extracción independiente. B. Nordvag et al., en *Method in Neurosciences*, volumen 26 (1995), páginas 15-25, y en *BioTechniques* (1992), volumen 12, nº 4, páginas 490-491, describen protocolos adecuados para la multiplicación de DNA de células sanguíneas, y los métodos se aplican igualmente a una muestra de células procedente de líquido sinovial.

Cuando se lleva una PCR a cabo, se usarán preferiblemente tres parejas de cebadores distintas:

A) un conjunto de cebadores específico para las bacterias que causan la en-

fermedad, específico así para *Janthinobacterium* y especies relacionadas (preferiblemente diseñado para la multiplicación del gen de rRNA 16S);

B) un conjunto de cebadores para la multiplicación de otro gen de las bacterias que causan la enfermedad, que no está tan sumamente conservado como los genes de rRNA 16S; por ejemplo, para parte de uno de los genes de rRNA 23S; y

C) un gen estándar humano, tal como el de β -actina, que puede ser usado para la normalización de la cantidad de señal bacteriana para que sea una señal de genes humanos derivados de células sinoviales humanas.

El ensayo puede ser llevado rápida y convenientemente a cabo utilizando sólo el anterior conjunto (A) de cebadores.

Las células se lisarán preferiblemente en un ciclo previo al método de PCR para hacer el DNA accesible para la hibridación de cebadores. Después de la PCR, se usan técnicas estándares para visualización de geles.

Visto alternativamente, el presente invento proporciona un componente para detección bacteriana para uso en el diagnóstico de una osteoartritis bacteriana primaria en un paciente del que se sospecha que tiene osteoartritis. Como se discutió anteriormente, los componentes para detección bacteriana adecuados incluyen sondas y cebadores de ácido nucleico que pueden ser diseñados para detectar bacterias en general o un género o especie particular. En particular, los componentes permiten detectar la especie relacionada con *Janthinobacterium* que los inventores presentes han hallado vinculada con la OA. Otros componentes para detección bacteriana incluyen anticuerpos.

El "agente" puede ser simplemente una disolución, suspensión, etc., que contiene el componente para detección bacteriana y está, o es capaz de estar, en una forma conveniente para que se lleve a cabo el método diagnóstico sobre una muestra. El agente se pondrá típicamente en contacto con la muestra con objeto de determinar si están presentes bacterias o no.

También se describe un kit para el diagnóstico de OA bacteriana primaria, que comprende un componente para detección bacteriana, preferiblemente un agente como el anteriormente definido. El "componente para detección bacteriana" es típicamente una o más moléculas oligonucleotídicas, tal como, por ejemplo, una pareja de cebadores de ácido nucleico que permite detectar las bacterias diana responsables de los síntomas de la OA. El kit puede también incluir preferiblemente uno o más de los compuestos siguientes: una DNA polimerasa (que está exenta de DNA contaminante en la medida de lo posible), dNTPs, tampones y un reactivo para facilitar la so-

lubilización de RNA/DNA.

En aún otro aspecto, el presente invento proporciona un producto que contiene (a) un agente antibacteriano como el aquí definido y (b) un antagonista de óxido nítrico, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o sucesivo en el tratamiento de la OA bacteriana primaria, mediante el tratamiento de una infección bacteriana que es responsable de la OA. Un "antagonista de óxido nítrico" es cualquier componente que sirve para reducir la concentración local de óxido nítrico en la zona que rodea la articulación, tal como, por ejemplo, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa.

En un aspecto más, el presente invento proporciona un producto que contiene (a) un agente antibacteriano como el aquí definido y (b) un agente que puede romper DNA, que será preferiblemente una enzima tal como DNasa I, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de la OA bacteriana primaria, mediante el tratamiento de una infección bacteriana que es responsable de la OA.

El invento será adicionalmente descrito con referencia a los siguientes Ejemplos no restrictivos y las Figuras, en que:

La Figura 1 es un croquis que muestra una plastia de fosa durante la reconstrucción del ligamento cruzado anterior. Se extirpa cartílago de la pared lateral de la fosa.

La Figura 2 es una fotografía basada en una visualización óptica que muestra cartílago focalmente dañado en el cóndilo femoral medial. La fotografía se tomó durante una artroscopia.

La Figura 3 es una fotografía basada en una visualización óptica que muestra cambios osteoartróticos avanzados en una rodilla. De nuevo, la fotografía se tomó durante una artroscopia.

La Figura 4 es un organigrama de la tecnología SMART. La figura está adaptada del manual de usuario del kit SMART™ para síntesis de cDNA por PCR, de Clontech.

La Figura 5 es una fotografía de un gel que muestra los resultados de la remultiplicación de bandas diferencialmente expresadas. Se aíslan las bandas entre 200 y 600 pares de bases (bp; del inglés, base pairs) y se usan para clonación, secuenciación y posterior verificación.

La Figura 6 es la primera secuencia aislada de pacientes mediante presentación diferencial. Fue un análisis de esta secuencia mediante FASTA lo que con-

dujo al inventor a sospechar por vez primera la presencia de bacterias.

La Figura 7 es una fotografía de un gel que muestra la detección de señales de RNA ribosómico 16S a partir de cultivos testigo de *E. coli*. Carril 1 = RNA bacteriano testigo, Carril 2 = 1/10 x RNA bacteriano, Carril 3 = agua. La transcripción inversa se lleva a cabo con el cebador R1492, y la PCR con F27/R1492. Se aplicaron al gel 5 µl de cada mezcla de reacción PCR.

La Figura 8 es una fotografía de un gel que muestra la señal de 16S en biopsias de cartílago. Se cargaron los carriles del modo siguiente:

Carril	ID de la muestra
1	8A
2	8A
3	17A
4	17A
5	20A
6	20A
7	16N
8	16N
9	Mezcla magistral tratada + cebadores pero sin molde.

La transcripción inversa se llevó a cabo con el cebador R1474, la PCR con los cebadores F7/R1474, y se aplicaron 6 µl de cada mezcla de reacción PCR al gel.

La Figura 9 es una fotografía de un gel que muestra la señal de 16S en biopsias de cartílago. Se cargaron los carriles del modo siguiente:

Carril	ID de la muestra
1	8A
2	17A
3	16N
4	Testigo de agua

La transcripción inversa y la PCR se llevaron a cabo usando los cebadores de la Figura 8.

La Figura 10 es una fotografía que muestra fragmentos de DNA 16S multiplicados y purificados antes de la secuenciación. En algunas muestras, especialmente en tejidos normales, se observó un fragmento más pequeño (350 bp) con respecto al de las señales de 16S (1400 bp). Parecía que estos fragmentos más pequeños, cuando eran secuenciados, eran similares al rRNA humano 18S. Se cargó el gel de la manera siguiente:

Carril	ID de la muestra
1	Fragmento pequeño de 17A*
2	Fragmento grande de 17A
3	Fragmento grande de 20A
4	Fragmento pequeño de 17A*
5	Fragmento grande de 17A
6	Mezcla magistral tratada + cebadores (F7 y R1474) pero sin molde.

Se aplicaron 4 µl de cada producto de aislamiento de DNA al gel.

La Figura 11 es una representación esquemática que muestra la situación de cebadores en el rRNA 16s de longitud completa. La pareja F7/R1474 multiplicará el cDNA del rRNA 16s de longitud completa pero, cuando se usan para secuenciar, cada uno de estos cebadores proporcionará una información secuencial sobre unos pocos cientos de pares de bases, lo que no cubrirá la secuencia completa. Para obtener la secuencia completa del cDNA multiplicado, se usan los cebadores F10A, F10B, F10C, R10A, R10B y R10C como cebadores de secuenciación adicionales. En la tabla 1 se enumeran las secuencias nucleotídicas. De este modo, se genera una secuencia compuesta al usar información secuencial solapante obtenida por secuenciación con diversos cebadores directos. Se puede realizar el mismo proceso con los cebadores inversos para obtener una secuencia inversa compuesta y luego se pueden comparar las secuencias directa e inversa para crear una secuencia compuesta aún más precisa.

La Figura 12 es la secuencia del RNA 16s de longitud completa obtenida como una secuencia compuesta directa e inversa de la región A del paciente número 21, usando los cebadores descritos en la leyenda de la Figura 16. Esta secuencia se hallaba siempre en pacientes osteoartrotríticos y se halló que representaba a *Janthinobacterium* mediante una búsqueda en la base de datos del NCBI con Blastn.

La Figura 13 es una representación esquemática de cómo se pueden utilizar diferentes cebadores para diferenciar entre las secuencias de rRNA 16s de *Janthinobacterium* (J) y *Burkholderia* (B). Estas secuencias son generalmente bastante similares pero con regiones en que hay un elevado porcentaje de falta de apareamiento entre las dos especies. De este modo, los cebadores F25-/R25- multiplicarán moldes con una secuencia de tipo B, y los cebadores F21-/R21- multiplicarán moldes con una secuencia de tipo J. Esta técnica ayudó a alcanzar la conclusión de que la especie bacteriana implicada en la OA era *Janthinobacterium*, o una especie muy estrechamente relacionada con ella, y a identificar los mejores cebadores para uso en el dia-

gnóstico de la OA causada por infección bacteriana, F21-1 y R21-4.

La Figura 14 es una fotografía de un gel que muestra la detección de genes de rRNA 16S de patógeno en líquido sinovial. Se aisló DNA del líquido sinovial de una rodilla artrítica usando el kit TRIzol de Gibco BRL/Life Technologies. Se multiplicó la secuencia del rRNA 16s usando los cebadores diseñados a partir de la secuencia de rRNA 16s hallada en la muestra 21A. Se cargó el gel del modo siguiente:

Carril	ID de la muestra	Cebadores
1	DNA	F21-1/R21-4
2	DNA, dilución 1/10	F21-1/R21-4
3	Testigo de agua	F21-1/R21-4
4	DNA	F21-1/R21-5
5	DNA, dilución 1/10	F21-1/R21-5
6	Testigo de agua	F21-1/R21-5
L	Escala de DNA Plus de 1 kb, Gibco BRL/Life Technologies	

La Figura 15 es una fotografía de un gel que muestra un fallo para detectar rRNA 16S bacteriano en muestras de región normal (N) del paciente 31 y en un testigo de agua. Se cargaron los carriles del modo siguiente:

Carril	Muestra	Cebador directo	Cebador inverso
L	Escala de 1 kb+		
1	DNA de 31N-SF, dilución 1/10	F25-1	R25-3
2	DNA de 31N-SF, dilución 1/10	F25-1	R25-4
3	DNA de 31N-SF, dilución 1/10	F25-1	R25-5
4	DNA de 31N-SF, dilución 1/10	F25-2	R25-3
5	DNA de 31N-SF, dilución 1/10	F25-2	R25-4
6	DNA de 31N-SF, dilución 1/10	F25-2	R25-5
7	DNA de 31N-SF, dilución 1/10	F25-3	R25-4
8	DNA de 31N-SF, dilución 1/10	F25-3	R25-5
9	Testigo de agua	F25-1	R25-3
10	Testigo de agua	F25-1	R25-4
11	Testigo de agua	F25-1	R25-5
12	Testigo de agua	F25-2	R25-3
13	Testigo de agua	F25-2	R25-4
14	Testigo de agua	F25-2	R25-5
15	Testigo de agua	F25-3	R25-4
16	Testigo de agua	F25-3	R25-5

Si hubieran estado presentes bacterias en cualquiera de las muestras (incluso especies distintas de *Burkholderia*), se debería haber generado entonces una señal al usar estos cebadores directos e inversos.

La Figura 16 es un gráfico que muestra las calificaciones KOOS para "síntomas" antes y después del tratamiento con un antibiótico. $p = 0,100$.

La Figura 17 es un gráfico que muestra las calificaciones KOOS para "actividad diaria" antes y después del tratamiento con un antibiótico. $p = 0,429$.

La Figura 18 es un gráfico que muestra las calificaciones KOOS para "deporte y diversión" antes y después del tratamiento con un antibiótico. $p = 0,008$.

La Figura 19 es un gráfico que muestra las calificaciones KOOS para "calidad de vida" antes y después del tratamiento con un antibiótico. $p = 0,182$.

La Figura 20 es un gráfico que muestra las calificaciones KOOS para "dolor" antes y después del tratamiento con un antibiótico. $p = 0,386$.

La Figura 21 es un gráfico que muestra las calificaciones individuales de Lysholm antes y después del tratamiento con un antibiótico. $p = 0,003$.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Identificación de bacterias asociadas con el daño osteoartrítico

Biopsias clínicas de cartílago

El Comité Ético del Hospital de la Universidad de Tromsø aprobó la extirpación y el examen de cartílago para este estudio. Los pacientes que fueron sometidos al procedimiento de biopsia fueron informados oralmente y por escrito acerca del proyecto y firmaron un documento en que decían aceptar el uso del material para este proyecto de investigación.

Se tomaron de los pacientes las tres diferentes calidades de tejidos cartilagosos, normal, focalmente dañado y osteoartrítico, del modo siguiente:

1. Se tomó el cartílago normal (N) de rodillas que fueron sometidas a reconstrucción del ligamento cruzado anterior. Para reparar el ligamento, se usó un injerto que incluía un trozo de hueso de rótula, una parte del ligamento rotuliano y una cantidad de hueso de la tibia proximal. Cuando se pone el injerto en la rodilla, el procedimiento incluye la extirpación de algún cartílago del cóndilo femoral lateral de la rodilla (Figura 1). Esto se hace para dejar espacio suficiente para el nuevo ligamento en la flexión y extensión de la rodilla. Ninguna de las rodillas que se usaron para recoger cartílago normal tenía historia alguna de trauma durante los dos últimos meses, y no había signos de inflamación real en esas rodillas. El cartílago

extirpado se usó como muestra de tejido normal. Durante la operación, se sacó bajo condiciones estériles y se congeló inmediatamente por inmersión en nitrógeno líquido. Las muestras fueron almacenadas más tarde a -75 °C.

2. El cartílago focalmente dañado (D) procedía de zonas de rodillas, extirpado durante una reparación con trasplante de condrocitos (Figura 2), una técnica descrita por Mats Brittberg y colaboradores en 1994 [M. Brittberg, A. Landahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson y L. Peterson, N. Engl. J. Med., 6 de Octubre de 1994, 331 (14): 889-95]. Esta técnica incluye tomar una biopsia de la rodilla que se va a reparar, de una zona de la rodilla que no soporta peso, y de esta biopsia se aíslan las células y se dejan multiplicar in vitro durante aproximadamente tres semanas. Cuando se alcanza un número suficiente de células, se trasplantan las células a la rodilla después de la extirpación de la zona cartilaginosa dañada. El cartílago extirpado y dañado fue utilizado como una muestra de cartílago dañado. Esta biopsia también se extrajo bajo condiciones estériles.
3. El cartílago osteoartrítico (A) (Figura 3) se extirpó durante la operación de pacientes con osteoartritis avanzada hasta un grado que excluía la técnica de trasplante de células. Estas rodillas fueron sometidas a cirugía de reemplazo articular utilizando una prótesis. Durante el procedimiento operativo, el cartílago hubo de ser extirpado, y se tomaron zonas de cartílago con los cambios más avanzados y se recogieron bajo condiciones estériles.

Detalles de otros materiales utilizados en los experimentos

Cebadores

Se utilizaron los cebadores siguientes. Para la transcripción inversa, se usaron los cebadores inversos (R; del inglés, *reverse*) R-1492 y R-1474. Para la PCR, se usaron generalmente las parejas F-27/R1492 y F-7/R-1474 [F = directo (del inglés, *forward*)]. Más adelante, en la Tabla 1, se indican las secuencias de los cebadores.

Los cebadores se compraron a Sigma-Genosys. Para la síntesis de cDNA, los cebadores se diluyeron hasta 2,5 picomoles/μl en agua. Para la PCR, los cebadores se diluyeron hasta 50 picomoles/μl en agua.

Se prefieren generalmente F-7/R-1474 para la identificación del rRNA 16S bacteriano (o el gen que lo codifica) ya que se hibridan con una secuencia conservada entre varias especies bacterianas estudiadas. F21-2/R21-4 son adecuados para la identificación de la bacteria causal esencial *Janthinobacterium* (o especies estrechamente relacionadas).

Tabla 1

Cebador	Secuencia del cebador
F2521	5' - GCA AGT CGA ACG GCA GCA CGG GT -3'
F25-1	5' - GGA TAG CCC GGC GAA AGC CGG AT -3'
F25-2	5' - CCT TCG GGC CTC GCG CTA TAG GGT T -3'
F25-3	5' - TCC TTG GCC CTA ATA CGG TCG GGG G -3'
R25-3	5' - CCC CCG ACC GTA TTA GGG CCA AGG A -3'
R25-4	5' - TCC ACC TCT CAG CGG AAT TCC GA -3'
R25-5	5' - GCA ACC CTC TGT TCC GAC CAT TGT -3'
R2521	5' - GAT TAG CTC CCC CTC GCG GGT TGG -3'
F21-1	5' - GGG ATA ACG TAG CGA AAG TTA CGC TA -3'
F21-2	5' - TCG CAA GAC CTC ATG CTC GTG GAG C -3'
F21-3	5' - CGG TGA GAG CTA ATA TCT CTT GCT AAT -3'
R21-3	5' - ATT AGC AAG AGA TAT TAG CTC TCA CCG -3'
R21-4	5' - CCC TGA TCT CTC AAG GAT TCC AGC C -3'
R21-5	5' - GCG GCG CTC TGT ATG TAC CAT TGT ATC -3'
F-7	5' - ATC CTG GCT CAG ATT GAA CG -3'
R-1474	5' - TCA CCC CAG TCA TGA ATC CT -3'
F-27	5' - AGA GTT TGA TC (C/A) TGG CTC AG -3'
R-1492	5' - TAC GG (C/T) TAC CTT GTT ACG ACT T -3'
F10A	5' - GTG AGT GAA GAA GGC CTT CG -3'
F10B	5' - TGG GGG ATT CAT TTC CTT AF -3'
F10C	5' - AGC AGC CGC GGT AAT ACG -3'
R10A	5' - ATG ACG TGT GAA GCC CTA CC -3'
R10B	5' - TTA ATC CAC ATC ATC CAC CG -3'
R10C	5' - AGC CCG GGG ATT TCA CAT -3'
F27'	5' - AGA GTT TGA TC (C/A) TGG GTC AG -3'
F-8	5' - AGA GTT TGA TCC TGG YTC AG -3'
R-556	5' - CTT TAC GCC CAR TAA WTC CG -3'

Síntesis de cDNA

5

Se utilizó la transcriptasa inversa RNasa H⁻ Superscript II de Gibco BRL/Life Technologies (nº 18064-014 del catálogo) con su tampón y DTT. Los dNTPs se compraron a Promega (nº U1240 del catálogo).

Electroforesis en gel de agarosa y aislamiento de DNA

Se usó agarosa Seakem LE de MedProbe (nº 50004 del catálogo) para la electroforesis en gel.

5 Se usó el kit de extracción de gel QIAEX II de QIAGEN (nº 20021 del catálogo) para el aislamiento del DNA a partir de la agarosa.

Kit de secuenciación y condiciones

10 Para las reacciones de secuenciación, se usó el kit Thermo Sequenase con terminadores colorantes Cy-5, de Amersham Pharmacia Biotech (nº 27-2682-01 del catálogo). Para la purificación del producto de PCR de la secuenciación se usó Sephadex G-50 de Sigma (nº 9048-71-9 del catálogo). También se podría haber usado el kit ABI PRISM para secuenciación cíclica con terminadores BigDye.

Reactivos para PCR

15 Para la multiplicación del RNA ribosómico 16S por PCR se usó DNA polimerasa HotStarTaq de Qiagen (nº 203205 del catálogo). Las mezclas magistrales para PCR se trataron con DNasa I RQ1 exenta de RNasa, de Promega (nº M610A del catálogo).

20 Agua

Cuando se preparó RNA, se sintetizó cDNA y durante la PCR, se usó agua filtrada a través de filtros de 0,2 µm, tratada en autoclave, tratada con DEPC, exenta de DNasa y exenta de RNasa, de Ambion (nº 9915G del catálogo).

25 Método de presentación diferencial

En la técnica siguiente se combina la multiplicación de cDNA de longitud completa con la presentación diferencial. La PCR de cDNA SMART (Clontech Laboratories Inc., PR304-1) es una técnica originalmente desarrollada para multiplicar poblaciones/bancos de cDNA completo. Se sintetiza la primera cadena de cDNA utilizando un cebador de oligo-dT (cebador de CDS). La transcriptasa inversa (MMLV, RNasa H-) añade un pequeño número de restos de citidina tras la compleción de la primera cadena. Se hibrida un segundo cebador (cebador SMART II) con la dC-"cola", y la transcriptasa inversa cambia el molde. Los cebadores son diseñados para obtener la misma secuencia en ambos extremos del cDNA y, por lo tanto, al utilizar un cebador que se unirá a ambos extremos (cebador de PCR), podemos multiplicar exponencialmente la

30

35

población de mRNA (como cDNA) total.

Hemos usado la PCR de cDNA SMART para multiplicar cDNA construido a partir de muestras de mRNA muy pequeñas. Hemos usado luego el cDNA multiplicado como molde en reacciones de presentación diferencial.

5

Materiales y métodos

El material de muestra se obtuvo de un paciente que estaba siendo operado de artrosis unicompartimental en la rodilla; véase el Ejemplo 1. Se tomaron biopsias de la parte osteoartítica del cartílago. Se tomó cartílago normal de la zona no alterada de la misma rodilla. Las muestras de cartílago fueron congeladas en nitrógeno líquido durante 5 minutos y fueron luego guardadas a -75 °C hasta que se llevó a cabo la extracción de RNA.

10

Extracción de RNA

El cartílago fue homogeneizado hasta un polvo fino con un mortero y su mano en nitrógeno líquido. Se aisló el RNA total usando el reactivo TRIZOL de Gibco (nº 15596). Se determinaron la concentración y la calidad del RNA midiendo las absorbancias a 260/280 y desarrollando una muestra en un gel de agarosa.

15

Síntesis de cDNA

Se realizaron las transcripciones inversas usando el kit SMART de Clontech (nº K1052-1) para síntesis de cDNA por PCR. Se siguieron las condiciones recomendadas por el fabricante. Se usaron 3 µl de disolución de RNA. Se usó la transcriptasa inversa de MMLV (200 U/µl; Gibco 18064-014).

20

25

Multiplicación de cDNA

Se multiplicó el cDNA total usando el kit SMART de Clontech (nº K1052-1) para síntesis de cDNA por PCR. Se utilizaron las condiciones recomendadas por el fabricante. Se multiplicaron 2 µl de cDNA de primera cadena en un volumen total de 50 µl con la polimerasa Advantage 2 KlenTaq de Clontech (nº 8430-1). Después de 25 ciclos, se examinó el producto de PCR en un gel de agarosa y se determinó la concentración de DNA midiendo las absorbancias a 260/280.

30

Presentación diferencial usando dos cebadores

Para las reacciones de presentación diferencial, se usó el kit Delta de

35

Clontech (nº K1810-1) para presentación diferencial. Se utilizaron las condiciones recomendadas por el fabricante. El cDNA multiplicado fue diluido hasta 0,02 µg/µl. Se usaron varias combinaciones de cebadores (los cebadores T y P incluidos en el kit) para explorar genes diferencialmente expresados.

5 En cada reacción se usó 1 µl de las diluciones de cDNA como molde. Las muestras fueron marcadas con [α]-³³P-dATP (Amersham) y fueron multiplicadas con la polimerasa Advantage 2 KlenTaq de Clontech (nº 8417-1). Después de tres ciclos de bajo rigor, se desarrollaron 25 ciclos de alto rigor. Los productos de PCR fueron separados en un gel para secuenciación [urea 7 M, acrilamida al 4% (37,5:1), TBE
10 0,5x] con espaciadores de 0,2 mm, a 500 V, hasta que el colorante azul de bromofenol hubo salido del gel. Los geles fueron visualizados por exposición de una película BioMax MR durante ½-1 día.

 Las bandas diferencialmente expresadas fueron cortadas de los geles secados superponiendo la película para señalar las bandas antes de aislar el material
15 del gel usando un escalpelo. Se añadieron 100 µl de agua a cada corte de gel en un tubo Eppendorf. Los cortes fueron luego incubados a 37 °C durante la noche. Los tubos fueron centrifugados a 14.000g y 4 °C durante 15 minutos. Los productos de elución fueron luego guardados a -20 °C. Se utilizaron 5 µl de cada producto de elución, como molde, en una reacción de multiplicación usando las mismas condiciones que en
20 la PCR de presentación diferencial (sin marcación). Se examinaron los productos de PCR en un gel de agarosa. Cierta mancha resultaba evidente, y se separó un volumen más grande en un gel más grande. Se cortaron las bandas de interés del gel de agarosa y se aisló el DNA usando el kit QIAEX II de Qiagen (nº 20021). Se siguió el procedimiento del fabricante. Se eluyó el DNA en 20 µl de agua. Se volvió a multiplicar de
25 nuevo el DNA usando la polimerasa *pfu* Turbo (nº 600252-51). Cada 50 µl de mezcla de reacción contenían 1 µl de molde, cebadores T y P 40 pM, dNTP 100 µM, tampón 10x y 1,25 U de enzima. Se desarrolló la PCR con las condiciones siguientes: inicio a 94 °C durante 9 minutos, 43 ciclos de 94 °C durante 30 segundos y 60 °C durante 1 minuto, y un alargamiento final a 60 °C durante 10 minutos.

30 Después de examinar un ensayo desarrollado en un gel de agarosa, se desarrollaron reacciones paralelas en 2 tubos y se reunieron los productos. Se aisló el DNA de la mezcla de reacción PCR usando el sistema QIAEX II de Qiagen para purificación de DNA. Se siguieron las recomendaciones del fabricante. Se eluyó el DNA en 15 µl de agua. Se desarrolló una muestra en un gel de agarosa. Tras la visualización,
35 no hubo bandas ni manchas adicionales visibles.

Clonación

El cDNA remultiplicado fue clonado en el vector de clonación pGEM-T Easy (nº A1360, Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.). La ligación se llevó a cabo con una concentración de vector de 50 ng/µl. Se ensayó por PCR la presencia de un inserto plasmídico del tamaño esperado, usando los mismos cebadores que en la presentación diferencial y cortando el vector con la enzima de restricción *EcoRI*.

Los fragmentos de PCR clonados fueron secuenciados usando el cebador T7. Las secuencias halladas mostraban una acusada homología con conocidas secuencias génicas humanas. Además eran 3-4 veces más largas que la EST media.

10

Presentación diferencial usando un cebador

Se utilizaron cebadores aleatorios de 10 monómeros (Operon Technologies, Alameda, California, EE.UU.) para multiplicar el cDNA sin radiactividad. Cada mezcla de reacción de 50 µl contenía 1 µl de cDNA, 80 pM de un cebador, 200 µM de cada dNTP, tampón 10x y 2,5 U de polimerasa HotStarTaq (Qiagen). Se desarrolló la PCR con las condiciones siguientes: inicio a 95 °C durante 15 minutos, 40 ciclos de 94 °C durante 2 minutos, 38 °C durante 2 minutos y 68 °C durante 1 minuto y 25 segundos, y un alargamiento final a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de multiplicación por PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1,5% (agarosa 1000, Gibco) en tampón de TAE con guanosina 1 mM y fueron visualizados con bromuro de etidio. La agarosa 1000 es capaz de resolver bandas separadas por 10 bp. Las bandas diferencialmente expresadas fueron cortadas, aisladas y clonadas en el vector pGEM-T Easy sin una multiplicación adicional.

20

Resultados

Un aspecto importante de nuestra estrategia es multiplicar la población de cDNA total antes de usarla como molde en reacciones PCR con presentación diferencial utilizando el kit de PCR Smart™ de Clontech (Figura 4).

La comparación de los productos de PCR con presentación diferencial procedentes de muestras de cartílago (sanas y osteoartríticas) mostró genes expresados en una muestra pero no en la otra.

30

Después de la presentación diferencial, el cDNA puede ser eluido del material de gel. El cDNA puede ser luego remultiplicado utilizando los mismos cebadores (RT-PCR) que en el procedimiento de presentación diferencial (Figura 5).

35

Rescate génico a partir del banco mediante PCR inversa

Después de la secuenciación, se diseñaron dos cebadores internos con un solapamiento de 100%. Se utilizaron estos cebadores internos para multiplicar el gen completo usando el banco de cDNA en el vector pTriplEx2 (Clontech) como molde. El cDNA fue empaquetado en λ TriplEx2, que es convertido en pTriplEx2 por transducción en *E. coli* BM25.8. Al utilizar el banco de cDNA de pTriplEx2 con los cebadores internos determinados, sólo se multiplica el plásmido con el gen de interés. Los cebadores son diseñados a partir de la secuencia de un *gen diferencialmente expresado*. Después de la transformación de JM109 con él, el gen diferencialmente expresado es secuenciado.

Identificación de RNA ribosómico 16S bacteriano en muestras de cartílago

Extracción de RNA

Los tejidos cartilaginosos recién congelados fueron homogeneizados hasta un polvo fino con un mortero y su mano sobre nitrógeno líquido. Se aisló el RNA total usando el reactivo TRIZOL de Gibco (nº 15596). Se determinó la calidad del RNA sometiendo una muestra a electroforesis en un gel de agarosa.

Síntesis de cDNA de primera cadena

Se mezclaron los componentes siguientes en un tubo Eppendorf:

2 μ l de cebador de RT (R1474, 5 picomoles)

2 μ l de muestra de RNA

8 μ l de H₂O (tratada con DEPC, exenta de RNasa)

Se calentó el tubo a 90 °C durante 5 minutos y luego se enfrió lentamente hasta la temperatura ambiental.

Se preparó la mezcla magistral para RT-PCR:

/Una reacción

4 μ l de tampón para primera cadena

2 μ l de DTT 0,1 M

1 μ l de dNTPs 10 mM

Se añadieron 7 μ l de mezcla magistral para RT a cada mezcla de reacción y luego se incubó el tubo a 42 °C durante 2 minutos.

Se añadió 1 μ l de transcriptasa inversa Superscript II a cada mezcla de reacción. Luego se incubaron los tubos a 42 °C durante 50 minutos. Se detuvieron las reacciones mediante calentamiento a 100 °C durante 10 minutos. Luego se pusieron

rápidamente los tubos sobre hielo.

Luego se añadieron 80 µl de agua tratada con DEPC a cada tubo.

Multiplicación por PCR

5 Preparación, y tratamiento con DNasa, de la mezcla magistral para PCR

1 reacción

5 µl de tampón 10x

2 µl de Mg²⁺ 25 mM

1 µl de dNTPs 10 mM

37,5 µl de H₂O

2,5 µl de DNasa I

La mezcla magistral para PCR fue incubada a 37 °C durante 1 hora, y luego hervida durante 5 minutos y puesta sobre hielo. Se añadieron los reactivos siguientes.

1 reacción

1 µl de mezcla de cebadores (50 picomoles/µl de cebador directo + 50 picomoles/µl de cebador inverso)

0,25 µl de DNA polimerasa HotStarTaq

10 Para cada reacción PCR, se mezcló 1 µl de cDNA de primera cadena con 49 µl de mezcla magistral para PCR en un tubo para PCR de 0,2 ml de capacidad. Se llevó a cabo la siguiente PCR en un termociclador Peltier PTC-200 de MJ Research.

95 °C 8 minutos

12X

95 °C 40 segundos

70 °C 40 segundos

-1 °C/ciclo

72 °C 2 minutos

15X

95 °C 40 segundos

58 °C 40 segundos

72 °C 2 minutos

20X

95 °C 40 segundos

56 °C 40 segundos

72 °C 2 minutos

4 °C mantenimiento

Los productos de la PCR fueron luego almacenados a -20 °C.

Electroforesis en gel de agarosa

5 Se desarrollaron los productos de la PCR, uno al lado del otro, en un gel de agarosa al 0,8%. Se desarrollaron minigeles (6x10 cm) durante 50 minutos a 90 V en tampón de TAE 1x. Para los minigeles, una muestra típica era 6 µl de producto de PCR. Paralelamente a las muestras, se desarrolló una escala de DNA Plus de 1 kb de Gibco para la determinación del tamaño de los fragmentos de DNA.

10 Los geles fueron teñidos en disolución de EtBr (0,5 µg/ml de agua) durante 20 minutos. Luego fueron desteñidos mediante diversos lavados en agua durante aproximadamente 40 minutos.

Los geles fueron visualizados en un sistema de BioRad para documentación de geles.

15 Aislamiento de DNA a partir del gel de agarosa

20 Para el aislamiento preparativo de DNA para su secuenciación, se llevaron a cabo cuatro reacciones PCR idénticas en paralelo. Los productos combinados fueron luego desarrollados en un gel con pocillos grandes. Se utilizaron las mismas condiciones que en la visualización previa. Después de la tinción, se pusieron los geles en un transiluminador UV de baja intensidad y se cortaron rápidamente las bandas de interés con escalpelos estériles. Hemos hallado que el empapamiento del gel en una disolución 1 mM de guanosina (Grundemann y Schoming) antes de la visualización UV de las bandas eliminaba las complicaciones en la secuencia de DNA debidas al daño del DNA por la radiación UV. Un trozo de gel típico pesaba aproximadamente
25 150-200 mg.

Se aisló el DNA de los fragmentos del gel utilizando el kit QIAEX II de QIAGEN (nº 20021 del catálogo) para extracción de gel. Se siguieron las condiciones del fabricante. Los fragmentos de DNA se eluyeron en 25 µl de Tris-HCl 10 mM, pH de 8,5.

La calidad del DNA aislado fue comprobada desarrollando una pequeña cantidad (2 μ l) en un minigel del modo anteriormente descrito. En la Figura 10 se muestra un ejemplo de fragmentos de DNA purificados, aislados antes de la secuenciación del DNA.

5

Secuenciación del DNA

Mezclas de Cy-5-dNTP

Se prepararon cuatro mezclas de Cy-5-dNTP (A, C, G, T) para cuatro reacciones de secuenciación.

4 reacciones (mezclas MA, MC, MG, MT)

2 μ l de dNTPs 1,1 mM

1 μ l de Cy-5-dNTP (A, C, G o T)

7 μ l de H₂O

1 μ l de EDTA 0,55 mM

10

Los tubos que contienen Cy-5-dNTPs deben ser mantenidos sobre hielo en la oscuridad en todo momento.

Se preparó una mezcla magistral para secuenciación.

1 reacción

8 μ l de molde de DNA

2 μ l de cebador (directo o inverso)

3,5 μ l de tampón de reacción

0,9 μ l de Thermo Sequenase

12,6 μ l de H₂O

Se añadió lo siguiente a cuatro tubos para PCR.

A: 2 μ l de MA

15

C: 2 μ l de MC

G: 2 μ l de MG

T: 2 μ l de MT

Se añadieron 6 μ l de mezcla magistral para secuenciación a cada uno de los cuatro tubos.

20

Se llevó a cabo la PCR siguiente:

30X

95 °C 30 segundos

57 °C 30 segundos

72 °C 80 segundos

Los productos de la reacción de secuenciación fueron purificados en columnas de Sephadex G-50 para centrifugación (conjunto de 96 pocillos). Los productos fueron secados después en la oscuridad a 37 °C y fueron luego resuspendidos en disolución para detención de secuenciación (8 µl). Las muestras (4 µl) fueron luego tratadas en un secuenciador ALF de Amersham-Pharmacia bajo condiciones estándares.

Resultados

Detección de RNA 16S en cartílago de pacientes con osteoartritis

10 Resultados de la PCR

Después de habérnoslas arreglado para probar el protocolo mediante la detección de RNA 16S usando cultivos bacterianos diluidos de *Escherichia coli* (Figura 7), probamos este método sobre muestras clínicas de cartílago.

La designación de los carriles/tejidos es (N) para regiones normales o no afectadas, (D) para regiones dañadas y (A) para regiones osteoartíticas. Una articulación de un paciente puede tener regiones de OA obviamente avanzada, regiones que parecen bastante normales y zonas que no están en las fases avanzadas de la OA pero en que el cartílago es blando y en cierto grado está fibrilado; esta última zona es definida como dañada.

20 Los resultados se muestran más adelante en las Figuras y la Tabla 2.

Los resultados muestran que la presencia de señales de 16S pueden ser siempre asociadas con pacientes osteoartíticos. Aunque, de vez en cuando, el tejido aislado de pacientes osteoartíticos no revelaba señales de RNA 16S al utilizar las condiciones de PCR estándares, nunca se detectó una señal de RNA 16S en tejidos de pacientes normales.

La Tabla 2 posterior proporciona un resumen de la detección de secuencias de rRNA 16S en muestras clínicas. A = osteoartítica y N = normal. Se utilizaron dos tipos de testigo: testigo de H₂O (blanco) y RNA total de *E. coli* como testigo positivo. La transcripción inversa se realizó con el cebador R1474. La multiplicación por PCR se llevó a cabo utilizando los cebadores F7 y R1474. Los números de la columna "muestra" son los números de los pacientes. Algunas muestras aparecen más de una vez en la tabla porque la muestra fue analizada más de un día.

Tabla 2

Muestra	Positiva	Negativa
8A	*	
17A	*	
20A	*	
16N		*
Testigo de <i>E. coli</i>	*	
H ₂ O		*
8A	*	
17A	*	
H ₂ O		*
8A	*	
17A	*	
16N		*
H ₂ O		*
8A		*
17A	*	
H ₂ O	*	
21A	*	
H ₂ O		*
21A	*	
H ₂ O		*
25A	*	
H ₂ O		*
25A	*	
H ₂ O		*

25A	*	
H ₂ O	*	
25A	*	
H ₂ O		*
25A	*	
H ₂ O		*
25A	*	
21A	*	
H ₂ O	*	
21A	*	
H ₂ O	*	
8A	*	
17A	*	
20A	*	
16N		*
H ₂ O	*	
17A	*	
20A	*	
H ₂ O	*	
8A	*	
17A		*
20A	*	
15A		*
H ₂ O		*
8A	*	
15A	*	
17A	*	

20A	*	
16N		*
H ₂ O	*	
8A	*	
15A	*	
16N		*
H ₂ O	*	
8A		*
17A	*	
20A	*	
16N		*
H ₂ O	*	
8A	*	
15A	*	
17A	*	
20A	*	
16N		*
18N		*
H ₂ O		*

Análisis de secuencias

La primera secuencia de presentación diferencial aislada de pacientes (Figura 6) nos llevó a sospechar de la presencia de bacterias.

5 A continuación se muestra el resumen de un análisis FASTA de esta secuencia, que indica una similitud muy elevada con secuencias de origen procariótico.

Secuencias que producen alineaciones significativas: (bits) Valor

gb|AE000244.1|AE000244 Escherichia coli K-12 MG1655 section... 657 0.0

dbj|D90788.1|D90788 E.coli genomic DNA, Kohara clone #277(3... 657 0.0

dbj|D90787.1|D90787 E.coli genomic DNA, Kohara clone #276(3... 657 0.0

emb|X94992.1|ECNARG E.coli nitrite extrusion gene and secon... 657 0.0

<u>db D26057.1 STYNARK</u>	Salmonella typhimurium genes for SmvA ...	<u>156</u>	2e-35
<u>gb AE000220.1 AE000220</u>	Escherichia coli K-12 MG1655 section...	<u>79</u>	2e-12
<u>db D90757.1 D90757</u>	Escherichia coli genomic DNA. (27.3 - 2...	<u>79</u>	2e-12
<u>emb X69189.1 ECNARXL0</u>	E.coli narXL operon and partial narK ...	<u>79</u>	2e-12
<u>emb X15996.1 ECNARK</u>	E.coli narK gene and partial sequence o...	<u>79</u>	2e-12
<u>gb AF026945.1 AF026945</u>	Homo sapiens cig64 mRNA, partial seq...	<u>57</u>	1e-05
<u>gb U32804.1 U32804</u>	Haemophilus influenzae Rd section 119 of...	<u>43</u>	0.18
<u>gb AC009276.9 AC009276</u>	Homo sapiens chromosome 7 clone RP11...	<u>41</u>	0.74
<u>gb AE003592.1 AE003592</u>	Drosophila melanogaster genomic scaf...	<u>41</u>	0.74
<u>gb AF098951.1 AF098951</u>	Homo sapiens breast cancer resistanc...	<u>41</u>	0.74
<u>gb AF095856.1 AF095856</u>	Homo sapiens asthmatic clone 4 mRNA,...	<u>41</u>	0.74
<u>gb AF095855.1 AF095855</u>	Homo sapiens asthmatic clone 3 mRNA,...	<u>41</u>	0.74
<u>gb AF100329.1 AF100329</u>	Dendrobium grex Madame Thong-IN ovgl...	<u>41</u>	0.74
<u>gb AF013290.1 AF013290</u>	Meloidogyne incognita elongation fac...	<u>41</u>	0.74
<u>emb X65318.2 CVPGEMEX2</u>	Cloning vector pGEMEX-2	<u>41</u>	0.74
<u>emb X65317.2 CVPGEMEX1</u>	Cloning vector pGEMEX-1	<u>41</u>	0.74
<u>gb L36849.1 SYNSHDL</u>	Cloning vector pZEO (isolate SV1) phleo...	<u>39</u>	3.0
<u>ref NM_015880.1 </u>	Homo sapiens RIG-like 14-1 (LOC51047), mRNA	<u>39</u>	3.0
<u>gb L36850.1 SYNLAC2</u>	Cloning vector pZEO (isolate SVLac2) be...	<u>39</u>	3.0
<u>gb AE003496.1 AE003496</u>	Drosophila melanogaster genomic scaf...	<u>39</u>	3.0

Secuencias compuestas de diversas muestras de pacientes generadas al usar los cebadores aquí descritos han sido sometidas a análisis FASTA. Los resultados de estos indican la presencia de *Janthinobacterium* o una especie bacteriana muy estrechamente relacionada con ella en tejido con OA. Más adelante se presentan dos de dichos análisis a modo de ejemplo.

Mediante una búsqueda en la base de datos del NCBI con Blastn, se halló que la secuencia compuesta directa e inversa del tejido afectado del paciente 21 (Figura 12) representaba a *Janthinobacterium*. Esta secuencia se halló siempre en pacientes con OA.

Las 3 mejores alineaciones de esta secuencia al seguir una investigación con Blastn el 13 de Noviembre de 2000 fueron:

gi|3201903|gb|AF067655.1|AF067655 Uncultured Duganella clon... 2730 0.0

gi|5738214|gb|AF174648.1|AF174648 Janthinobacterium lividum... 2714 0.0
 gi|2832894|emb|Y08846.1|JL16SRRN J.lividum 16S rRNA gene 2714 0.0

Las alineaciones concretas fueron las siguientes:

>gi|3201903|gb|AF067655.1|AF067655 Uncultured Duganella clone CTHB-18 16S ribosomal RNA gene, partial

sequence

Length = 1453

Score = 2730 bits (1377), Expect = 0.0

Identities = 1393/1400 (99%)

Strand = Plus / Plus

Query: 44 catgcaagtcgaacggcagcacggagcttgctctggtggcgagtgccgaacgggtgagta 103
 ||| |

Sbjct: 27 catgtaagtcgaacggcagcacggagcttgctctggtggcgagtgccgaacgggtgagta 86

Query: 104 atatatcggaacgtaccctagagtggggataacgtagcgaaagttacgctaataaccgca 163
 |||

Sbjct: 87 atatatcggaacgtaccctagagtggggataacgtagcgaaagttacgctaataaccgca 146

Query: 164 tacgatctaaggatgaaagtgggggatcgcaagacctcatgctcgtggagcgccgatat 223
 |||

Sbjct: 147 ~~tac~~gatctaaggatgaaagtgggggatcgcaagacctcatgctcgtggagcgccgatat 206

Query: 224 ctgattagctagttggtagggtaaaagcctaccaaggcatcgatcagtagctggtctgag 283
 |||

Sbjct: 207 ctgattagctagttggtagggtaaaagcctaccaaggcatcgatcagtagctggtctgag 266

Query: 284 aggacgaccagccacactggaactgagacacgggtccagactcctacgggaggcagcagtg 343
 |||

Sbjct: 267 aggacgaccagccacactggaactgagacacgggtccagactcctacgggaggcagcagtg 326

Query: 344 gggaaatttggaacaatgggcaagcctgatccagcaatgccgcgtgagtgagaaggcc 403
 |||

Sbjct: 327 gggaaatttggaacaatgggcaagcctgatccagcaatgccgcgtgagtgagaaggcc 386

Query: 404 ttcgggttgtaaagctcttttgtcaggaagaacggtgagagctaataatctcttgctaa 463

|||||

Sbjct: 387 ttcgggttgtaaagctcttttgtcaggaagaacggtgagagctaataatctcttgctaa 446

Query: 464 tgacggtacctgaagaataagcaccggctaactacgtgccagcagcccggtataacgta 523

|||||

Sbjct: 447 tgacggtacctgaagaataagcaccggctaactacgtgccagcagcccggtataacgta 506

Query: 524 gggtgcaagcgtaatacgggaattactggcgtaaacggtgcgcagcggttttgtaagtc 583

|||||

Sbjct: 507 gggtgcaagcgtaatacgggaattactggcgtaaacggtgcgcagcggttttgtaagtc 566

Query: 584 tgatgtgaaatccccgggtcaacctgggaattgcattggagactgcaaggctagaatct 643

|||||

Sbjct: 567 tgatgtgaaatccccgggtcaacctgggaattgcattggagactgcaaggctagaatct 626

Query: 644 ggcagagggggtagaattccacgttagcagtgaatgcgtagatatgtggaggaacac 703

|||||

Sbjct: 627 ggcagagggggtagaattccacgttagcagtgaatgcgtagatatgtggaggaacac 686

Query: 704 cgatggcgaaggcagccccctgggtcaagattgacgctcatgcacgaaagcggtggggagc 763

|||||

Sbjct: 687 cgatggcgaaggcagccccctgggtcaagattgacgctcatgcacgaaagcggtggggagc 746

Query: 764 aaacaggattagataccctggtagtcacgcctaaacgatgtctactagttgtcgggtc 823

|||||

Sbjct: 747 aaacaggattagataccctggtagtcacgcctaaacgatgtctactagttgtcgggtc 806

Query: 824 ttaattgacttggtaacgcagctaacgcgtgaagtagaccgcctggggagtagcggtcgca 883

|||||

Sbjct: 807 ttaattgacttggtaacgcagctaacgcgtgaagtagaccgcctggggagtagcggtcgca 866

Query: 884 agattaaaactcaaaggaattgacggggaccgcacaaagcgggtggatgatgtggattaat 943

|||||

Sbjct: 867 agattaaaactcaaaggaattgacggggaccgcacaaagcgggtggatgatgtggattaat 926

Query: 944 tcgatgcaacgcgaaaaaccttacctacccttgacatggctggaatccttgagagatcag 1003
|||||

Sbjct: 927 tcgatgcaacgcgaaaaaccttacctacccttgacatggctggaatccttgagagatcag 986

Query: 1004 ggagtgctcgaaagagaaccagtacacaggtgctgcatggctgctcagctcgtgctgt 1063
|||||

Sbjct: 987 ggagtgctcgaaagagaaccagtacacaggtgctgcatggctgctcagctcgtgctgt 1046

Query: 1064 gagatggtgggttaagtcccgcaacgagcgcaacccttgctcattagttgctacgaaagg 1123
|||||

Sbjct: 1047 gagatggtgggttaagtcccgcaacgagcgcaacccttgctcattagttgctacgaaagg 1106

Query: 1124 cactctaagagactgccggtgacaaaccggaggaaggtgggatgacgtcaagtcctca 1183
|||||

Sbjct: 1107 cactctaagagactgccggtgacaaaccggaggaaggtgggatgacgtcaagtcctca 1166

Query: 1184 tggcccttatgggtagggttcacacgtcatacaatggtacatacagagcggccaacc 1243
|||||

Sbjct: 1167 tggcccttatgggtagggttcacacgtcatacaatggtacatacagagcggccaacc 1226

Query: 1244 cgcgagggggagctaatacgcagaaagtgtatcgtagtccggattgtagtctgcaactcga 1303
|||||

Sbjct: 1227 cgcgagggggagctaatacgcagaaagtgtatcgtagtccggattgtagtctgcaactcga 1286

Query: 1304 ctgcatgaagttggaatcgctagtaatcgcggatcagcatgtcncggtnaanacgttccc 1363
|||||

Sbjct: 1287 ctgcatgaagttggaatcgctagtaatcgcggatcagcatgtcncggtgaatacgttccc 1346

Query: 1364 gggctttgtacacaccgcccgtcacaccatgggagcgggtttaccagaagtaggtagct 1423
|||||

Sbjct: 1347 gggctttgtacacaccgcccgtcacaccatgggagcgggtttaccagaagtaggtagct 1406

Query: 1424 tanccncaaggaggcgctt 1443
|| || |||

Sbjct: 1407 taaccgtaaggaggcgctt 1426

>gi|5738214|gb|AF174648.1|AF174648 *Janthinobacterium lividum* 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence

Length = 1486

Score = 2714 bits (1369), Expect = 0.0

Identities = 1391/1400 (99%)

Strand = Plus / Plus

Query: 44 catgcaagtcgaacggcagcacggagcttgcctcgtggtggcgagtggcgaacgggtgagta 103
|||||

Sbjct: 27 catgcaagtcgaacggcagcacggagcttgcctcgtggtggcgagtggcgaacgggtgagta 86

Query: 104 atatatcggaacgtaccctagagtgggggataacgtagcgaaagttagcctaataccgca 163
|||||

Sbjct: 87 atatatcggaacgtaccctagagtgggggataacgtagcgaaagttagcctaataccgca 146

Query: 164 tacgatctaaggatgaaagtgggggatcgcaagacctcatgctcgtggagcggccgatat 223
|||||

Sbjct: 147 tacgatctaaggatgaaagtgggggatcgcaagacctcatgctcgtggagcggccgatat 206

Query: 224 ctgattagctagttggtagggtaaaagcctaccaaggcatcgatcagtagctggtctgag 283
|||||

Sbjct: 207 ctgattagctagttggtagggtaaaagcctaccaaggcatcgatcagtagctggtctgag 266

Query: 284 aggacgaccagccacactggaactgagacacgggtccagactcctacgggaggcagcagtg 343
|||||

Sbjct: 267 aggacgaccagccacactggaactgagacacgggtccagactcctacgggaggcagcagtg 326

Query: 344 gggaaatgttgacaatggggcgaagcctgatccagcaatgccgcgtgagtgaagaaggcc 403
|||||

Sbjct: 327 gggaaatgttgacaatggggcgaagcctgatccagcaatgccgcgtgagtgaagaaggcc 386

Query: 404 ttcgggttgtaaagctcttttgcagggaagaaacgggtgagagctaataatctcttgctaa 463
|||||

Sbjct: 387 ttcgggttgtaaagctcttttgcagggaagaaacgggtgagagctaataatctcttgctaa 446

Query: 464 tgacggtacctgaagaataagcaccggctaactacgtgccagcagccgcgtaatacgt 523
 |||

Sbjct: 447 tgacggtacctgaagaataagcaccggctaactacgtgccagcagccgcgtaatacgt 506

Query: 524 gggtgcaagcgttaatcggattactggcgtaaaagcgtgcgagcggttttgaagtc 583
 |||

Sbjct: 507 gggtgcaagcgttaatcggattactggcgtaaaagcgtgcgagcggttttgaagtc 566

Query: 584 tgatgtgaaatccccggctcaacctgggaattgcattggagactgcaaggctagaatct 643
 |||

Sbjct: 567 tgatgtgaaatccccggctcaacctgggaattgcattggagactgcaaggctagaatct 626

Query: 644 ggcagagggggtagaattccacgtgtagcagtgaatgcgtagatatgtggaggaacac 703
 |||

Sbjct: 627 ggcagagggggtagaattccacgtgtagcagtgaatgcgtagatatgtggaggaacac 686

Query: 704 cgatggcgaaggcagccccctgggtcaagattgacgctcatgcacgaaagcgtggggagc 763
 |||

Sbjct: 687 cgatggcgaaggcagccccctgggtcaagattgacgctcatgcacgaaagcgtggggagc 746

Query: 764 aaacaggattagataccctggtagtccacgccctaaacgatgtctactagttgtcgggtc 823
 |||

Sbjct: 747 aaacaggattagataccctggtagtccacgccctaaacgatgtctactagttgtcgggtc 806

Query: 824 ttaattgacttggtaacgcagctaacgcgtgaagtagaccgcctggggagtacggtcgca 883
 |||

Sbjct: 807 ttaattgacttggtaacgcagctaacgcgtgaagtagaccgcctggggagtacggtcgca 866

Query: 884 agattaaaactcaaaggaattgacggggaccgcacaaagcggtgatgatgtggattaat 943
 |||

Sbjct: 867 agattaaaactcaaaggaattgacggggaccgcacaaagcggtgatgatgtggattaat 926

Query: 944 tcgatgcaacgcgaaaaaccttacctacccttgacatggctggaatccttgagagatcag 1003
 |||

Sbjct: 927 tcgatgcaacgcgaaaaaccttacctacccttgacatggctggaatcctcgagagattga 986

Query: 1004 ggagtgctcgaaagagaaccagtacacaggtgctgcatggctgctcagctcgtgctgct 1063
 |||

Sbjct: 987 ggagtgctcgaaagagaaccagtacacaggtgctgcatggctgctcagctcgtgctgct 1046

Query: 1064 gagatggtgggtaagtcccgcacgagcgcaacccttgctcattagttgctacgaaagg 1123
 |||

Sbjct: 1047 gagatggtgggtaagtcccgcacgagcgcaacccttgctcattagttgctacgaaagg 1106

Query: 1124 cactctaagagactgccggtgacaaaccggaggaaggtggggatgacgtcaagtccctca 1183
 |||

Sbjct: 1107 cactctaagagactgccggtgacaaaccggaggaaggtggggatgacgtcaagtccctca 1166

Query: 1184 tggcccttatgggtagggcttcacacgtcatacaatggtacatacagagcgccccaacc 1243
 |||

Sbjct: 1167 tggcccttatgggtagggcttcacacgtcatacaatggtacatacagagcgccccaacc 1226

Query: 1244 cgcgagggggagctaatacgcagaaagtgtatcgtagtcggattgtagctcgaactcga 1303
 |||

Sbjct: 1227 cgcgagggggagctaatacgcagaaagtgtatcgtagtcggattgtagctcgaactcga 1286

Query: 1304 ctgcatgaagttggaatcgctagtaatcgcggatcagcatgtcncggtnaanacgttccc 1363
 |||

Sbjct: 1287 ctgcatgaagttggaatcgctagtaatcgcggatcagcatgtcncggtnaanacgttccc 1346

Query: 1364 gggctctgtacacaccgcccgtcacaccatgggagcgggttttaccagaagtaggtagct 1423
 |||

Sbjct: 1347 gggctctgtacacaccgcccgtcacaccatgggagcgggttttaccagaagtaggtagct 1406

Query: 1424 tanccncaaggaggcgctt 1443
 |||

Sbjct: 1407 taaccgcaaggaggcgctt 1426

>gi|2832894|emb|Y08846.1|JL16SRRN J.lividum 16S rRNA gene

Length = 1469

Score = 2714 bits (1369), Expect = 0.0

Identities = 1391/1400 (99%)

Strand = Plus / Plus

Query: 44 catgcaagtcgaacggcagcacggagcttgctctggtggcgagtggcgaacgggtgagta 103
|||||
Sbjct: 26 catgcaagtcgaacggcagcacggagcttgctctggtggcgagtggcgaacgggtgagta 85

Query: 104 atatatcggaacgtaccctagagtgggggataacgtagcgaaagttagcctaataccgca 163
|||||
Sbjct: 86 atatatcggaacgtaccctagagtgggggataacgtagcgaaagttagcctaataccgca 145

Query: 164 tacgatctaaggatgaaagtgggggatcgcaagacctcatgctcgtggagcggccgatat 223
|||||
Sbjct: 146 tacgatctaaggatgaaagtgggggatcgcaagacctcatgctcgtggagcggccgatat 205

Query: 224 ctgattagctagttggttaggtaaaagcctaccaagcatcgatcagtagctggtctgag 283
|||||
Sbjct: 206 ctgattagctagttggttaggtaaaagcctaccaagcatcgatcagtagctggtctgag 265

Query: 284 aggacgaccagccacactggaactgagacacggtccagactcctacgggaggcagcagtg 343
|||||
Sbjct: 266 aggacgaccagccacactggaactgagacacggtccagactcctacgggaggcagcagtg 325

Query: 344 gggaaat~~ttt~~ggacaatgggcgaaagcctgatccagcaatgccgcgtgagtgaagaag~~g~~ 403
|||||
Sbjct: 326 gggaaat~~ttt~~ggacaatgggcgaaagcctgatccagcaatgccgcgtgagtgaagaaggcc 385

Query: 404 ttcgggttgtaaagctcttttgtcaggaagaacggtgagagctaataatctcttgctaa 463
|||||
Sbjct: 386 ttcgggttgtaaagctcttttgtcaggaagaacggtgagagctaataatctcttgctaa 445

Query: 464 tgacggtacctgaagaataagcaccggctaactacgtgccagcagccgcgtaatacgt 523
|||||
Sbjct: 446 tgacggtacctgaagaataagcaccggctaactacgtgccagcagccgcgtaatacgt 505

Query: 524 gggtgcaagcgtaatacggtaactactgggcgtaaacgctgcgcagggcggttttgtaagtc 583
|||||
Sbjct: 506 gggtgcaagcgtaatacggtaactactgggcgtaaacgctgcgcagggcggttttgtaagtc 565

Query: 584 tgatgtgaaatccccgggctcaacctgggaattgcattggagactgcaaggctagaatct 643
|||||
Sbjct: 566 tgatgtgaaatccccgggctcaacctgggaattgcattggagactgcaaggctagaatct 625

Query: 644 ggcagagggggtagaattccacgtgtagcagtgaaatgcgtagatatgtggaggaacac 703
|||||
Sbjct: 626 ggcagagggggtagaattccacgtgtagcagtgaaatgcgtagatatgtggaggaacac 685

Query: 704 cgatggcgaaggcagccccctgggtcaagattgacgctcatgcacgaaagcgtggggagc 763
|||||
Sbjct: 686 cgatggcgaaggcagccccctgggtcaagattgacgctcatgcacgaaagcgtggggagc 745

Query: 764 aaacaggattagataccctggtagtagccacgcctaaacgatgtctactagttgtcgggtc 823
|||||
Sbjct: 746 aaacaggattagataccctggtagtagccacgcctaaacgatgtctactagttgtcgggtc 805

Query: 824 ttaattgacttgtaacgcagctaacgcgtgaagtagaccgcctggggagtacggtcgca 883
|||||
Sbjct: 806 ttaattgacttgtaacgcagctaacgcgtgaagtagaccgcctggggagtacggtcgca 865

Query: 884 agattaaaactcaaaggaattgacggggaccgcacaaagcgggtggatgatgtggattaat 943
|||||
Sbjct: 866 agattaaaactcaaaggaattgacggggaccgcacaaagcgggtggatgatgtggattaat 925

Query: 944 tcgatgcaacgcgaaaaaccttacctacccttgacatggctggaatecttgagagatcag 1003
|||||
Sbjct: 926 tcgatgcaacgcgaaaaaccttacctacccttgacatggctggaatccccgagagattgg 985

Query: 1004 ggagtgctcgaaagagaaccagtagcacaggtgctgcatggctgctcagctcgtgctcgt 1063
 |||

Sbjct: 986 ggagtgctcgaaagagaaccagtagcacaggtgctgcatggctgctcagctcgtgctcgt 1045

Query: 1064 gagatgttgggttaagtcccgaacgagcgaacccttgtcattagttgctacgaaagg 1123
 |||

Sbjct: 1046 gagatgttgggttaagtcccgaacgagcgaacccttgtcattagttgctacgaaagg 1105

Query: 1124 cactctaagtagactgccggtgacaaccggaggaaggtggggatgacgtcaagtcctca 1183
 |||

Sbjct: 1106 cactctaagtagactgccggtgacaaccggaggaaggtggggatgacgtcaagtcctca 1165

Query: 1184 tggcccttatgggtagggcttcacacgcatatacaatggtacatacagagcgcgccaacc 1243
 |||

Sbjct: 1166 tggcccttatgggtagggcttcacacgcatatacaatggtacatacagagcgcgccaacc 1225

Query: 1244 cgcgagggggagctaatacgcagaaagtgtatcgtagtcggattgtagtctgcaactcga 1303
 |||

Sbjct: 1226 cgcgagggggagctaatacgcagaaagtgtatcgtagtcggattgtagtctgcaactcga 1285

Query: 1304 ctgcatgaagttggaatcgctagtaatcgcggatcagcatgtcncggtnaanacgttccc 1363
 |||

Sbjct: 1286 ctgcatgaagttggaatcgctagtaatcgcggatcagcatgtcgcggtgaatacgttccc 1345

Query: 1364 gggctctgtacacaccgccggtcacaccatgggagcgggtttaccagaagtaggtagct 1423
 |||

Sbjct: 1346 gggctctgtacacaccgccggtcacaccatgggagcgggtttaccagaagtaggtagct 1405

Query: 1424 taccncaaggagggcgctt 1443
 ||

Sbjct: 1406 taaccgcaaggagggcgctt 1425

Se analizó similarmente una secuencia compuesta (705 nucleótidos) del tejido afectado del paciente 17 usando el cebador directo F7, y las cuatro mejores ali-

neaciones a partir de una base de datos que contenía 671.573 secuencias fueron:

```

gb|AF174648.1|AF174648  Janthinobacterium lividum 16S riboso...  1315  0.0
gb|AF067655.1|AF067655  Uncultured Duganella clone CTHB-18 l...  1315  0.0
dbj|AB021388.1|AB021388  Pseudomonas mephitica DNA for 16S r...  1315  0.0
emb|Y08846.1|JL16SRRN  J.lividum 16S rRNA gene  1315  0.0
    
```

5 A continuación se muestra la alineación concreta para la primera se-
cuencia de la lista:

```

gb|AF174648.1|AF174648  Janthinobacterium lividum 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
    
```

Length = 1486

Score = 1315 bits (658), Expect = 0.0

Identities = 681/689 (98%), Gaps = 3/689 (0%)

Strand = Plus / Plus

```

Query: 19  gagcttgctctggtggcgagtggcgaacgggtgagtaatatatcggaacgtaccctagag 78
          |||
Sbjct: 50  gagcttgctctggtggcgagtggcgaacgggtgagtaatatatcggaacgtaccctagag 109
    
```

```

Query: 79  tgggggataacgtagcgaaagttacgctaataccgcatacgcatacctagctgaaagtggg 138
          |||
Sbjct: 110 ..tgggggataacgtagcgaaagttacgctaataccgcatacgcatacctagctgaaagtggg 169
    
```

```

Query: 139 ggatcgcaagacctcatgctcgtggagcggccgatctgattagctagttggtagggta 198
          |||
Sbjct: 170 ggatcgcaagacctcatgctcgtggagcggccgatctgattagctagttggtagggta 229
    
```

```

Query: 199 aaagcctaccaaggcatcgatcagtagctggtctgagaggacgaccagccacactggaac 258
          |||
Sbjct: 230 aaagcctaccaaggcatcgatcagtagctggtctgagaggacgaccagccacactggaac 289
    
```

Query: 259 tgagacacggtccagactcctacgggaggcagcagtggggaatTTTggacaatgggcgaa 318

|||||

Sbjct: 290 tgagacacggtccagactcctacgggaggcagcagtggggaatTTTggacaatgggcgaa 349

Query: 319 a--ctgaatccagcaatgccgcgtgagtgagaaggccttcggggtgtaaagctctTTTg 376

| |||||

Sbjct: 350 agcctga-tccagcaatgccgcgtgagtgagaaggccttcggggtgtaaagctctTTTg 408

Query: 377 tcagggagaacacggtgagagctaatatctcttgctaatacgggtacctgaagaataagc 436

|||||

Sbjct: 409 tcagggagaacacggtgagagctaatatctcttgctaatacgggtacctgaagaataagc 468

Query: 437 accggctaactacgtgccagcagccgcggaatacgtagggtgcaagcgtaatacggaaat 496

|||||

Sbjct: 469 accggctaactacgtgccagcagccgcggaatacgtagggtgcaagcgtaatacggaaat 528

Query: 497 tactggcgtaaagcgtgagcagcggttttgtaagtctgatgtgaaatccccgggctca 556

|||||

Sbjct: 529 tactggcgtaaagcgtgagcagcggttttgtaagtctgatgtgaaatccccgggctca 588

Query: 557 acctgggaattgcattggagactgcaaggctagaatctggcagagggggtagaattcca 616

|||||

Sbjct: 589 acctgggaattgcattggagactgcaaggctagaatctggcagagggggtagaattcca 648

Query: 617 cgtgtagcagtraaatgcgtagatatgtggaggaaacaccgatggcgaagsvagccccctg 676

|||||

Sbjct: 649 cgtgtagcagtgaaatgcgtagatatgtggaggaaacaccgatggcgaaggcagccccctg 708

Query: 677 ggtcaagawtgacgctcatgcacaaaagc 705

||||||| ||||||||||||| |||||

Sbjct: 709 ggtcaagattgacgctcatgcacgaaagc 737

Aislamiento de RNA y DNA de líquido sinovial (LS)

Las muestras previamente discutidas procedían de biopsias pero, en un
 5 avance significativo, se ha mostrado también ahora que se puede hacer un diagnóstico
 a partir de una muestra del líquido sinovial que se puede obtener sin cirugía mediante
 un procedimiento mucho menos invasivo y traumático. A continuación se describe un
 protocolo adecuado.

Después de la recogida de LS del paciente, el LS fue guardado a 4 °C y,
 10 después de no más de 20 minutos, fue centrifugado a 13.000 rpm (aproximadamente
 12.500 g) durante 30 minutos a 4 °C. Se separó el sobrenadante y se guardó el sedi-
 mento de centrifugación a -72 °C hasta el aislamiento del RNA/DNA. Se añadió 1 ml
 de disolución de TRIzol al sedimento de centrifugación. El sedimento de centrifugación
 fue disuelto por remoción y fue luego incubado a temperatura ambiental durante 10
 15 minutos. Se añadieron 0,2 ml de cloroformo a la disolución y ésta fue mezclada des-
 pués por remoción y fue luego incubada a temperatura ambiental durante 15 minutos.

Luego se centrifugó la disolución a 13.000 rpm a 4 °C durante 15 minu-
 tos. Se separó la fase superior acuosa y se aisló el RNA del modo anteriormente des-
 crito. Se añadieron 0,3 ml de etanol a la fase de fenol-cloroformo y luego se mezcló la
 20 disolución por remoción. Luego se incubó la disolución a temperatura ambiental duran-
 te 15 minutos. Después se centrifugó a 2000 rpm (aproximadamente 4500 g) a 4 °C
 durante 5 minutos.

Se separó el sobrenadante y se lavó tres veces el sedimento de centri-
 fugación en 0,5 ml de citrato sódico 0,1 M con etanol al 10%. Después de cada lavado,
 25 se realizó una centrifugación a 2000 rpm (aproximadamente 4500 g) a 4 °C durante
 cinco minutos y se desechó el sobrenadante. Después del último lavado, el sedimento
 de centrifugación fue dejado secar al aire durante 30 minutos a temperatura ambiental.
 El sedimento de centrifugación fue resuspendido en 80 µl de NaOH 8 mM.

Ejemplo 2 – Tratamiento de pacientes osteoartíticos con antibióticos – Aspectos clínicos

En este estudio, se utilizó un antibiótico eficaz contra una gran variedad
 de bacterias Gram negativas y Gram positivas.

Introducción

Se diagnosticó la enfermedad de 30 pacientes y se trataron estos durante un mes con el antibiótico internacionalmente conocido de forma genérica como doxiciclina; este fue adquirido a Pfizer como Vibramicina. Se tomaron muestras del líquido sinovial antes y después del tratamiento.

Métodos

Se identificaron 30 pacientes que presentaban signos clínicos y radiológicos de osteoartritis. Se informó a estos pacientes, quienes firmaron un papel de acuerdo con las instrucciones del Comité Ético (Northern Norway Health Region 5).

Se utilizaron las calificaciones KOOS (Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score) [Roos et al.: "Development of a self-administered outcome measure", Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy 78 (2): 88-96, 1998] y de Lysholm [véase Tegner y Lysholm: "Rating Systems in the Evaluation of Knee Ligament Injuries", Clinical Orthopaedics and Related Research, nº 198, Setiembre de 1985, 43-49].

Durante la primera visita, se tomó una muestra del líquido sinovial (técnica estándar en el portal lateral superior), utilizando una jeringa de 10 ml de capacidad. Si había demasiado poco líquido y no se aspiraba líquido sinovial en seguida, se inyectaban 5-10 ml de disolución salina fisiológica-agua y se aspiraba de nuevo. Se pusieron inmediatamente las muestras en una nevera y se llevaron al laboratorio. Se administraron diariamente 100 mg de Vibramicina a todos los pacientes durante 4 semanas. De los pacientes en que se encontraron las bacterias, se tomaron nuevas muestras del líquido sinovial utilizando la misma técnica.

Resultados clínicos

Se observó una mejoría.

Es importante advertir que, en este sistema de calificación, valores mayores significan que los pacientes están mejor. Los valores pequeños indican más síntomas, por ejemplo, dolor. Todos los valores mejoraron en este estudio. Se considera una mejoría particularmente significativa cuando los valores de p son $\leq 0,05$.

KOOS

Se analizaron estos parámetros:

Síntomas

Actividad de la vida diaria

Deporte

Calidad de la vida diaria

Dolor

Lysholm

0-100: 100 es la mejor calificación posible y 0 es la peor.

- 5 Los resultados de estos ensayos se presentan en forma gráfica en las Figuras 16 a 21.

En la Tabla 3 siguiente se muestra un resumen de la respuesta al tratamiento con el antibiótico tetraciclina durante cuatro semanas, según se determina mediante preguntas directas a los pacientes sobre cómo se sentían.

Muestra/paciente	Estatus después de 4 semanas de tratamiento
2	mejorado
3	inalterado
4	inalterado
5	inalterado
6	mejorado
7	mejorado
8	inalterado
9	mejorado
10	mejorado
11	inalterado
12	inalterado
13	mejorado
14	mejorado
15	inalterado
16	mejorado
17	inalterado
18	inalterado
19	inalterado
20	inalterado
21	inalterado
22	inalterado
23	inalterado
24	inalterado
25	inalterado
26	mejorado
34	mejorado

Conclusión

Estos resultados respaldan nuestra hipótesis de que se puede tratar la osteoartritis con antibióticos. La Vibramicina mejoró todas las calificaciones clínicas del paciente.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un agente antibacteriano en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la osteoartritis bacteriana primaria al tratar una infección bacteriana que es responsable de la osteoartritis.

5 2. Un uso como el reivindicado en la Reivindicación 1, en que dicho agente antibacteriano es eficaz contra *Janthinobacterium*.

3. Un uso como el reivindicado en cualquier reivindicación precedente, en que dicho agente antibacteriano es seleccionado del grupo que comprende: claritromicina, levofloxacina, mercaptoetilguanidina, lactato de ciprofloxacina, tobramicina, 10 ceftazidima pentahidratada, gentamicina, ciproxina, rifampicina, doxiciclina, trimetoprima y sulfametoxazol.

4. Un uso como el reivindicado en cualquier reivindicación precedente, en que dicho medicamento comprende dos o más agentes antibacterianos.

5. Un uso como el reivindicado en cualquier reivindicación precedente, 15 en que el tratamiento comprende además la administración de un segundo medicamento que contiene otro agente antibacteriano o un agente que puede romper DNA.

6. Un uso como el reivindicado en la Reivindicación 5, en que dicho segundo medicamento contiene gentamicina, ciproxina o DNasa I.

7. Un uso como el reivindicado en la Reivindicación 6, en que dicho segundo medicamento está en una forma adecuada para inyección. 20

8. Un agente antibacteriano para uso en el tratamiento de la osteoartritis bacteriana primaria al tratar una infección bacteriana que es responsable de la osteoartritis.

9. Un producto que contiene (a) un agente antibacteriano y (b) un antagonista de óxido nítrico como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o sucesivo en el tratamiento de la osteoartritis bacteriana primaria al tratar una infección bacteriana que es responsable de la osteoartritis. 25

10. Un producto que contiene (a) un agente antibacteriano y (b) un agente que puede romper DNA como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o sucesivo en el tratamiento de la osteoartritis bacteriana primaria al tratar una infección bacteriana que es responsable de la osteoartritis. 30

11. Un método *in vitro* para diagnosticar una osteoartritis en un paciente del que se sospecha que tiene osteoartritis, método que comprende examinar una muestra de una articulación de dicho paciente en cuanto a la presencia de bacterias y, 35 cuando dichas bacterias están presentes, confirmar que dicha articulación está afecta-

da por una osteoartritis bacteriana primaria.

12. Un método como el reivindicado en la Reivindicación 11, en que las bacterias se detectan por medio de la unión de uno o más oligonucleótidos al ácido nucleico de dichas bacterias.

5 13. Un método como el reivindicado en la Reivindicación 11 ó 12, en que dicha muestra se pone en contacto con una pareja de cebadores capaz de unirse a secuencias diana del ácido nucleico de dichas bacterias.

10 14. Un método como el reivindicado en la Reivindicación 13, en que dichos cebadores son capaces de unirse a regiones del rRNA 16S de las bacterias o del gen que lo codifica.

15 15. Un método como el reivindicado en la Reivindicación 11, en que se detectan las bacterias utilizando anticuerpos.

16 16. Un método como el reivindicado en cualquiera de las Reivindicaciones 11 a 15, en que dicha muestra es una muestra del líquido sinovial.

17 17. Un componente para detección bacteriana para uso en el diagnóstico de una osteoartritis bacteriana primaria en un paciente del que se sospecha que tiene osteoartritis.

18 18. Un componente para detección bacteriana de acuerdo con la Reivindicación 17, en que dicho componente para detección es un oligonucleótido.

20 19. Un componente para detección bacteriana de acuerdo con la Reivindicación 18, en que dicho oligonucleótido es un cebador capaz de unirse a secuencias diana del ácido nucleico de dichas bacterias.

25 20. Un componente para detección bacteriana de acuerdo con la Reivindicación 19, en que dicho cebador es capaz de unirse a regiones del rRNA 16S de las bacterias o del gen que lo codifica.

21. Un componente para detección bacteriana de acuerdo con la Reivindicación 17, en que dicho componente para detección es un anticuerpo.

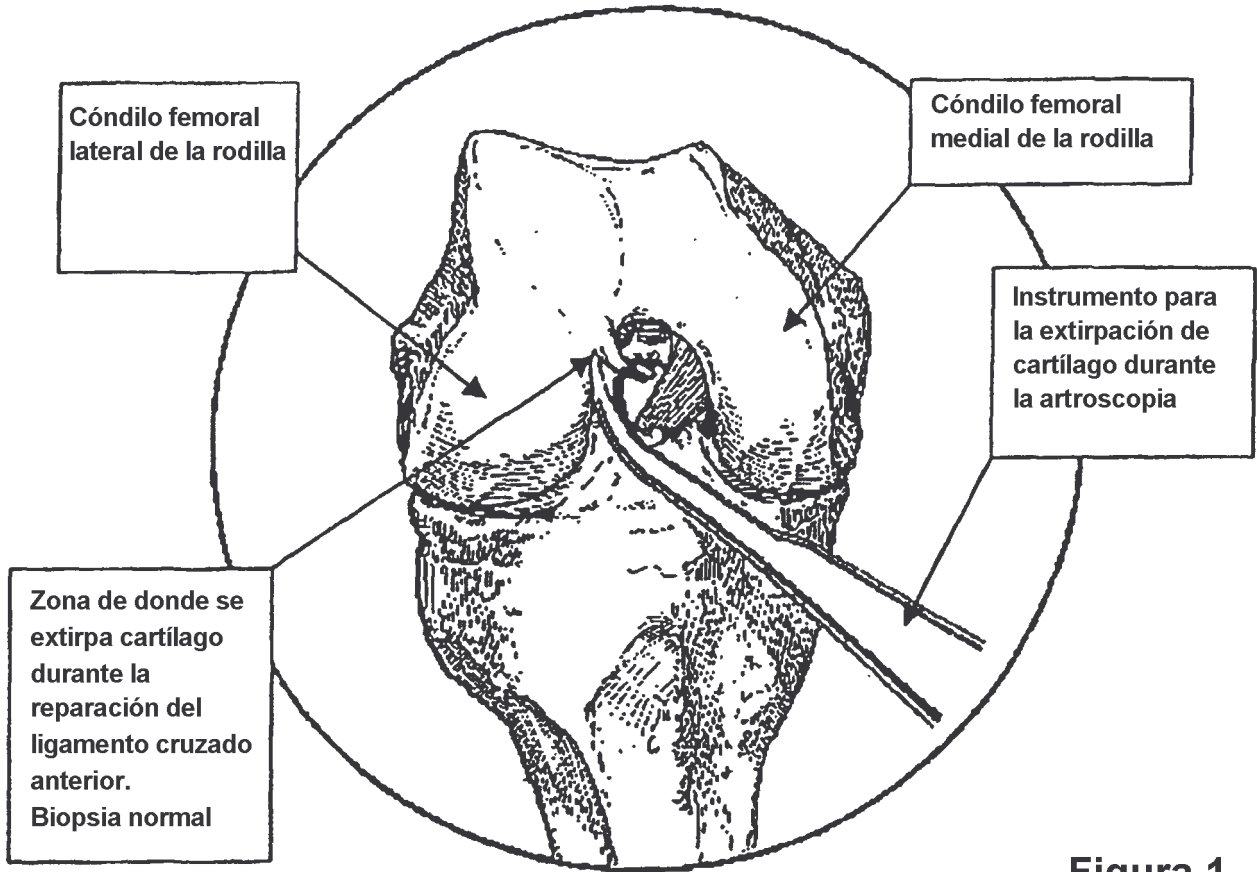


Figura 1

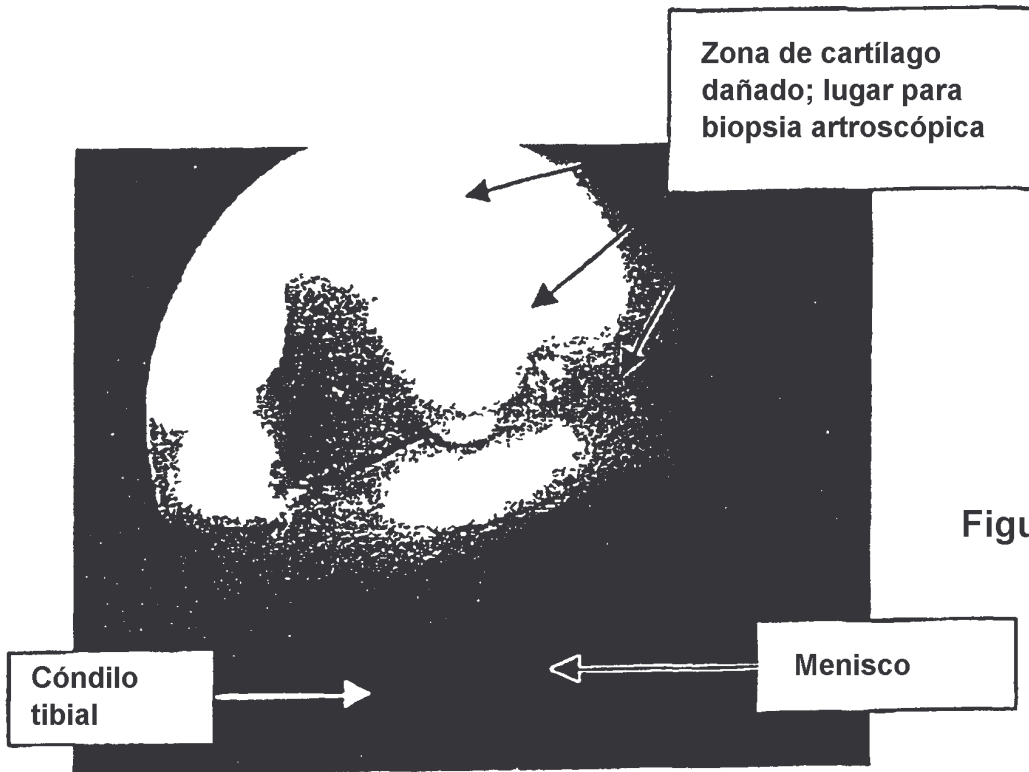


Figura 2

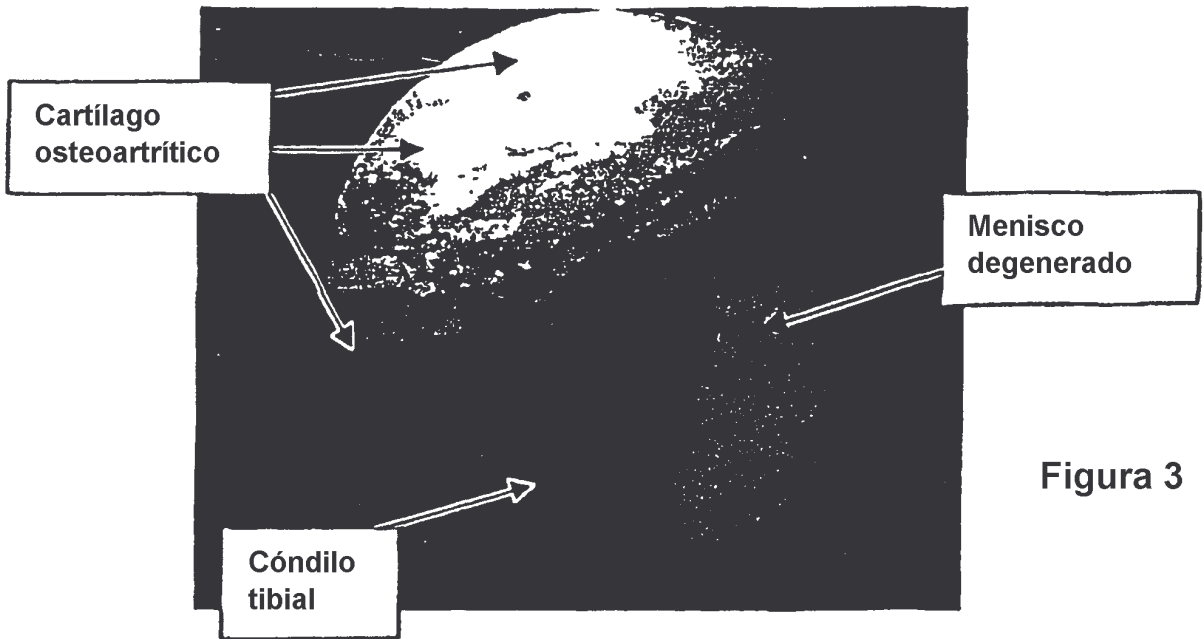


Figura 3

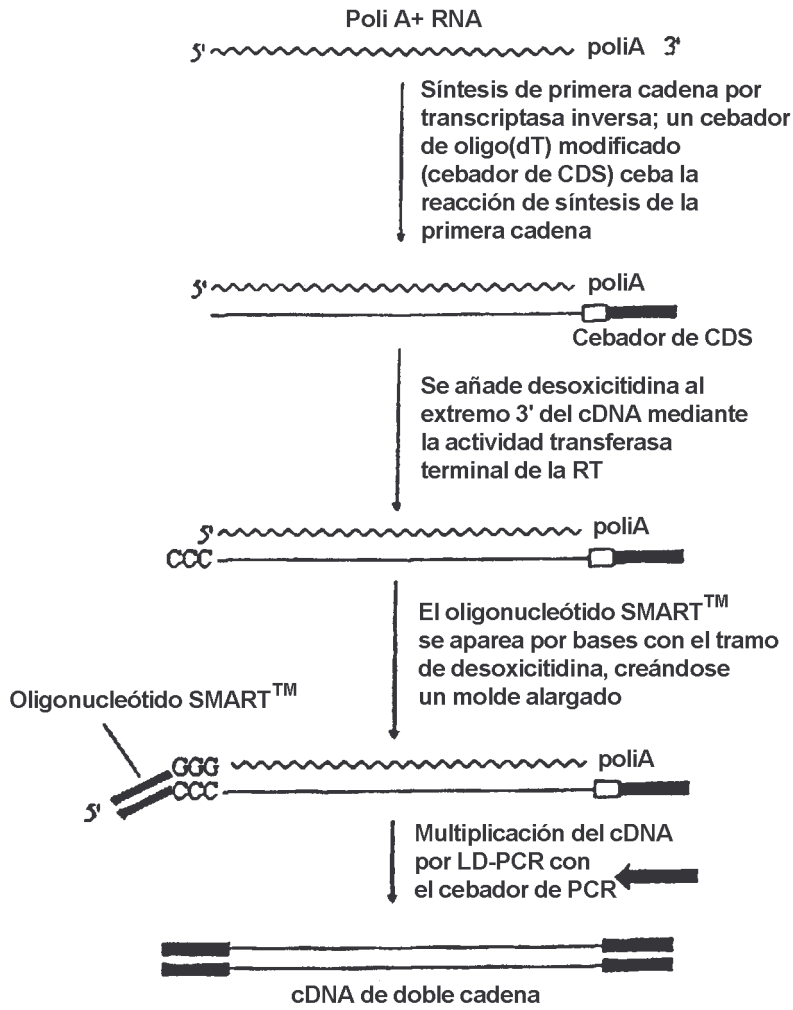


Figura 4

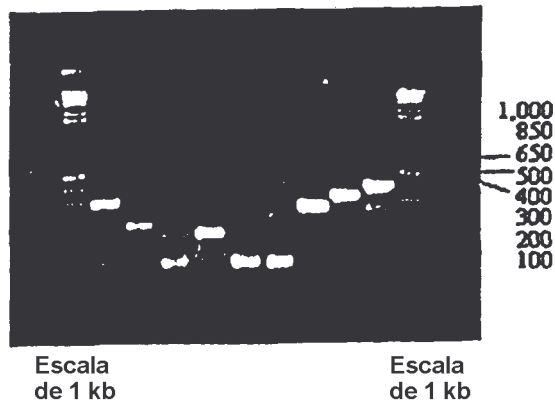


Figura 5

1 gcgactggaa acCAGAAAAT MCGGCCTTCT GGGARRATAA AGGAARACAT
51 ATTGCTCGAA GAAATCTCTG GATATCAGTC AGTTGTCTAC TTCTTGCCTT
101 CTGTGTCTGG ATGCTATTTA GCGCAGTTAC CGTTAATCTC AATAAAATCG
151 GTTTTAATTT TACTACCGAT CAACTCTTTT TTATTAACCC TCACTAAAGC
201 ACCGTCCATC GCGCTCCACC GAATATAGGC ACCATAAAGG AGTAGGGAAC
251 ACGCAATAAT GCGCCAGAAA CGGAGGGTAA TGCGGTTAAT AAAAAGAGTT
301 GATCGGTAGT AAAATTAATA CCGATTTTAT TGAGATTAAC GGTAAGTGGC
351 CTAAATAGCA TCCAGACACA GAAGGCAAGA AGTAGACAAC TGAAGTATAT
401 CCAGAGATTT CTTCGAGCAA TATGTTTTCC TTTATTTTCC CAGAAGGCCG
451 GATTTTCTGG TTTCCAGTCG CGCAAAGAT AACGACTATT TTTCTCATTT
501 TBGCAGTGCC ATATTGTTCC TCACATGCAC ATCATTGGTA ACgaaaaaaaa
551 aagatcac tcagcataat gagaaaaata gtcggtatct tttgcgcgac
601 trgaaaccwk aaaatccggy cttctgggaa watamatgga wavcathttg
651 ctccagaaag tctctggtak cagwctagtb tgmtattcct gashtttctt

Figura 6

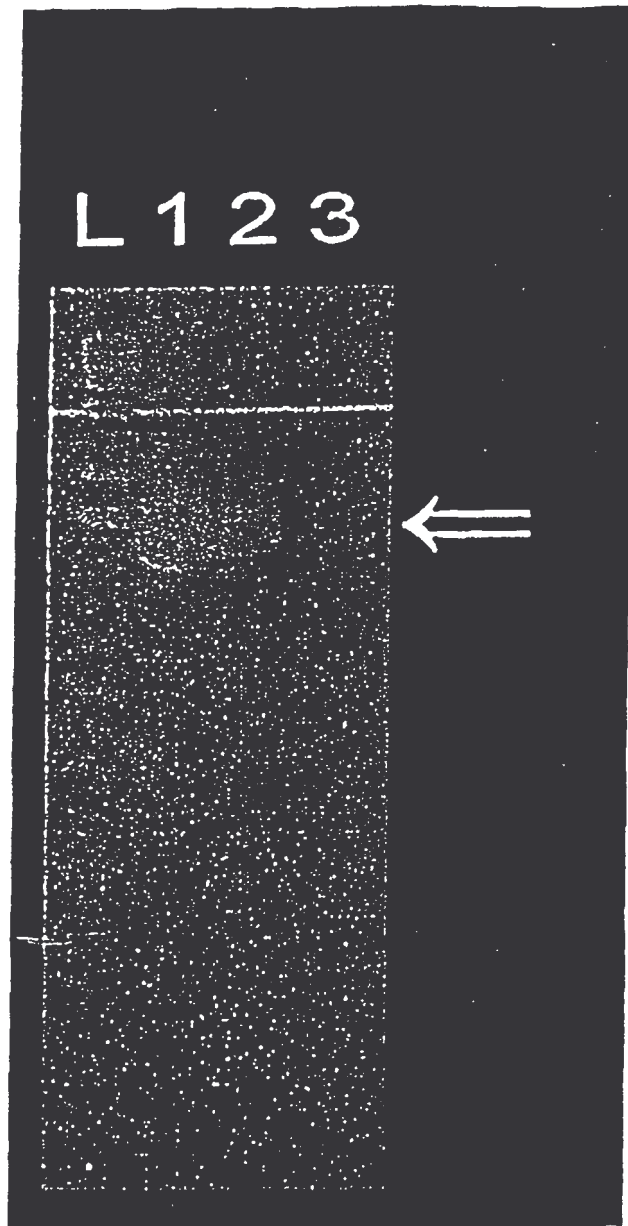


Figura 7

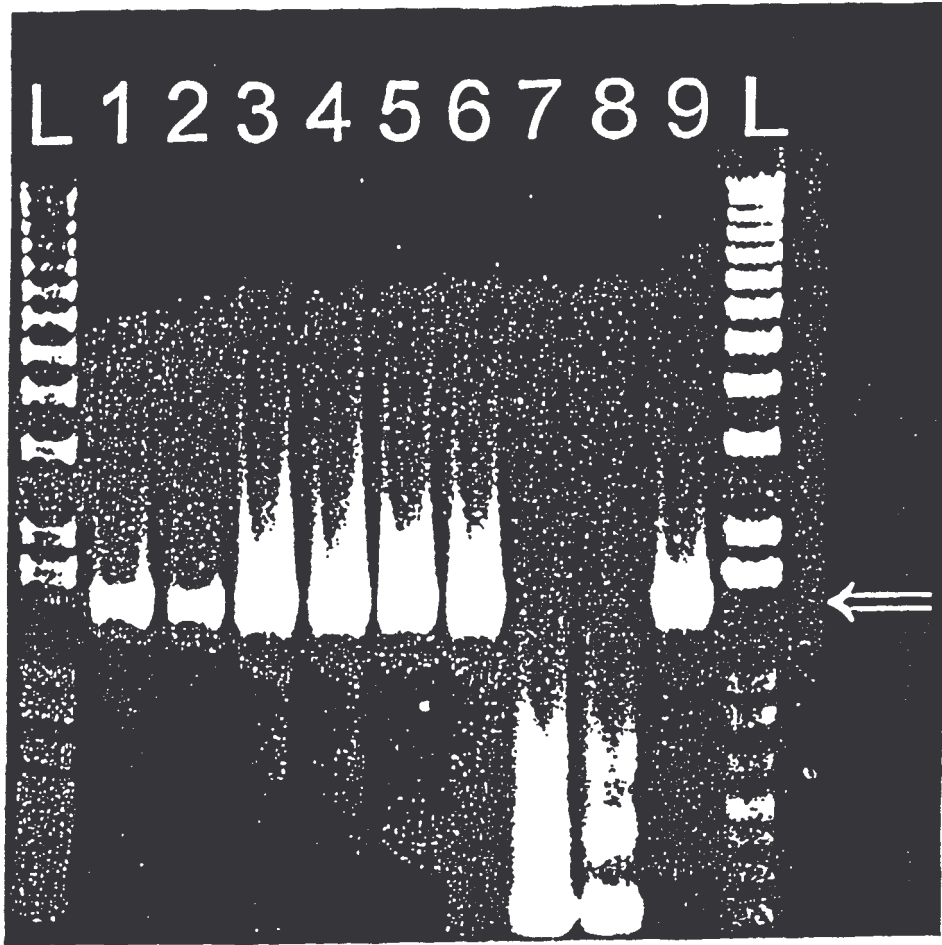


Figura 8

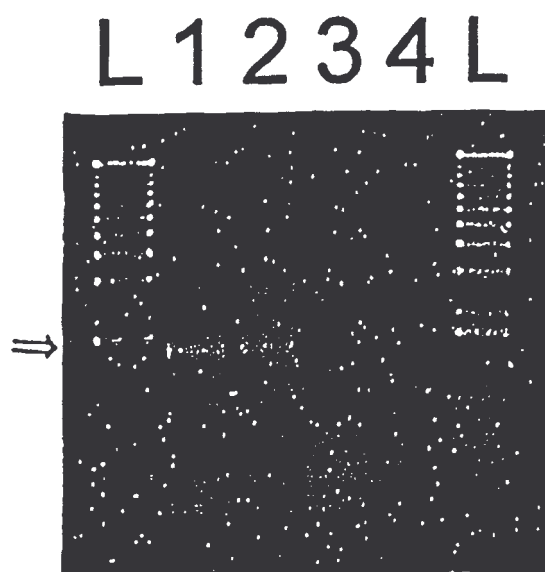


Figura 9

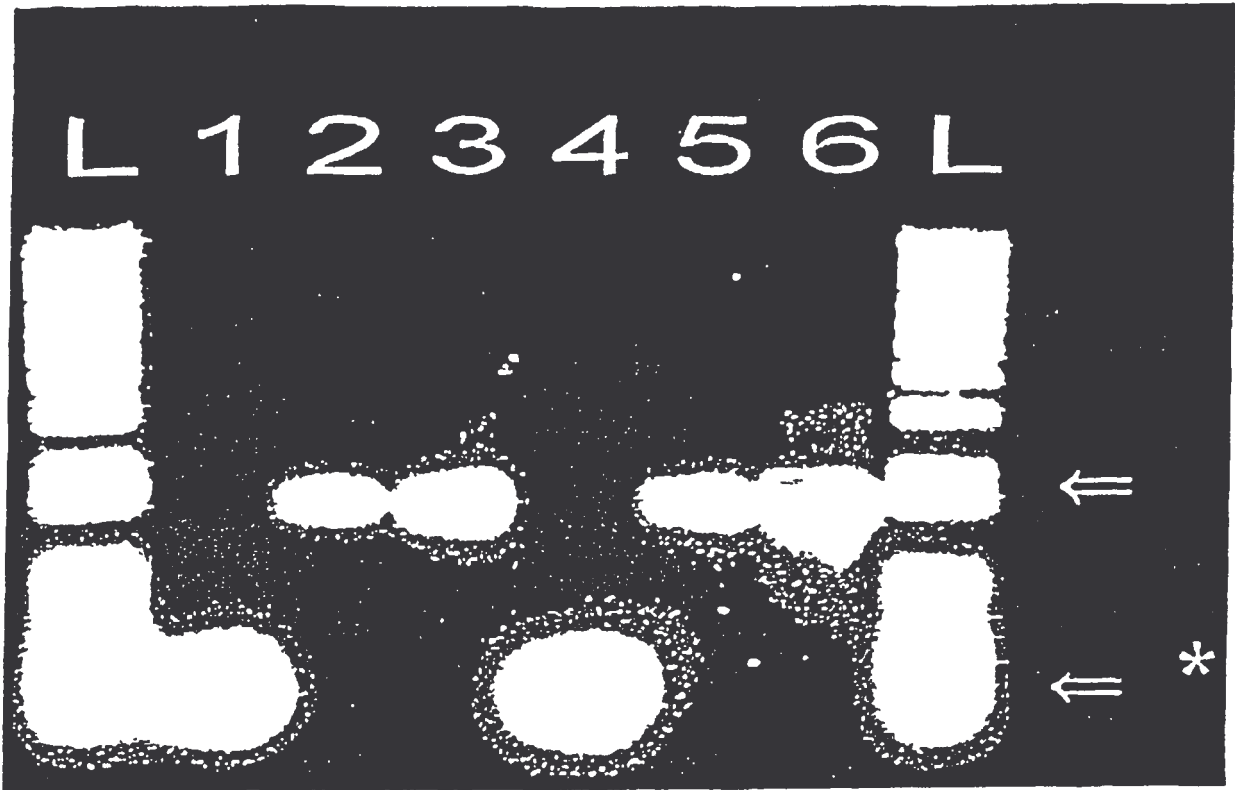


Figura 10

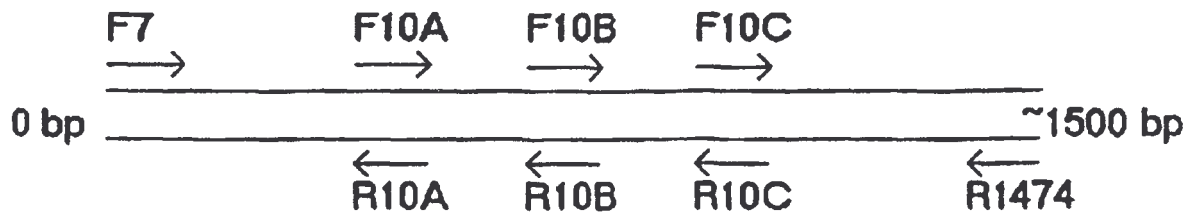


Figura 11

GNGGNNAGTG NNNGNNTNTN NTANTNTNNT NTTGATGCCC CACCATGCAA
 GTCGAACGGC AGCACGGAGC TTGCTCTGGT

GGCGAGTGGC GAACGGGTGA GTAATATATC GGAACGTACC CTAGAGTGGG
 GGATAACGTA GCGAAAGTTA CGCTAATACC

GCATACGATC TAAGGATGAA AGTGGGGGAT CGCAAGACCT CATGCTCGTG
 GAGCGGCCGA TATCTGATTA GCTAGTTGGT

AGGGTAAAAG CCTACCAAGG CATCGATCAG TAGCTGGTCT GAGAGGACGA
 CCAGCCACAC TGGAAGTGA ACACGGTCCA

GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATT TTGGACAATG GGCGAAAGCC
 TGATCCAGCA ATGCCGCGTG AGTGAAGAAG

GCCTTCGGGT TGTAAGCTC TTTTGTCAGG GAAGAAACGG TGAGAGCTAA
 TATCTCTTGC TAATGACGGT ACCTGAAGAA

TAAGCACCGG CTAACTACGT GCCAGCAGCCG CGGTAATAC
 GTAGGGTGA AGCGTTAATC GGAATTACTG GGCGTAAAGC

GTGCGCAGGC GGTTTTGTAA GTCTGATGT GAAATCCCCG
 GGCTCAACCT GGAATTGCA TTGGAGACT GCAAGGCTAG

AATCTGGCAG AGGGGGGTA GAATTCCACG TGTAGCAGTG
 AAATGCGTAG ATATGTGGAG GAACACCGAT GGCGAAGGCA

GCCCCCTGGG TCAAGATTGA CGCTCATGCA CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC
 AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCCT

AAACGATGTC TACTAGTTGT CGGGTCTTAA TTGACTTGGT AACGCAGCTA
 ACGCGTGAAG TAGACCGCCT GGGGAGTACG

GTCGCAAGAT TAAACTCAAA GGAATTGACG GGGACCCGCA CAAGCGGTGG
 ATGATGTGGA TTAATTCGAT GCAACGCGAA

AAACCTTACC TACCCTTGAC ATGGCTGGAA TCCTTGAGAG ATCAGGGAGT
 GCTCGAAAGA GAACCAGTAC ACAGGTGCTG

CATGGCTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGTAA GTCCCGCAAC
 GAGCGCAACC CTTGTCATTA GTTGCTACGA

AAGGGCACTC TAATGAGACT GCCGGTGACA AACCGGAGGA AGGTGGGGAT
 GACGTCAAGT CCTCATGGCC CTTATGGGTA

Figura 12

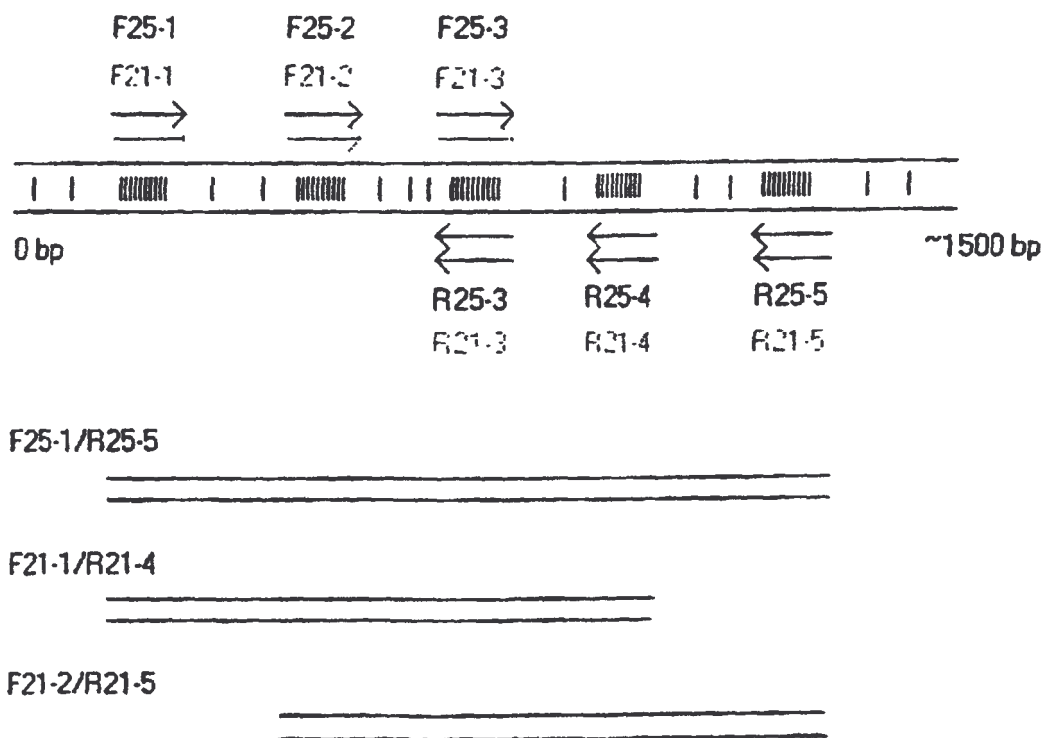
GGGCTTCACA CGTCATACAA TGGTACATAC AGAGCGCCGC CAACCCGCGA
 GGGGGAGCTA ATCGCAGAAA GTGTATCGTA


GTCCGGATTG TAGTCTGCAA CTCGACTGCA TGAAGTTGGA ATCGCTAGTA
 ATCGCGGATC AGCATGTCNC GGTNAANACG

TTCCCGGGTC TTGTACACAC CGCCCGTCAC ACCATGGGAG CGGGTTTTAC
 CAGAAGTAGG TAGCTTANCC NCAAGGAGGG

CGCTTCCAAG GSTATNNATCA AANNNNCNNN NNCNNNCCCC
 NNNC

Figura 12 (cont.)



 Región de DNA con un elevado porcentaje de falta de apareamiento entre secuencias de tipo B y J


 Una sola falta de apareamiento de bases entre secuencias de tipo B y J

Figura 13

L 1 2 3 4 5 6 L



Figura 14

L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

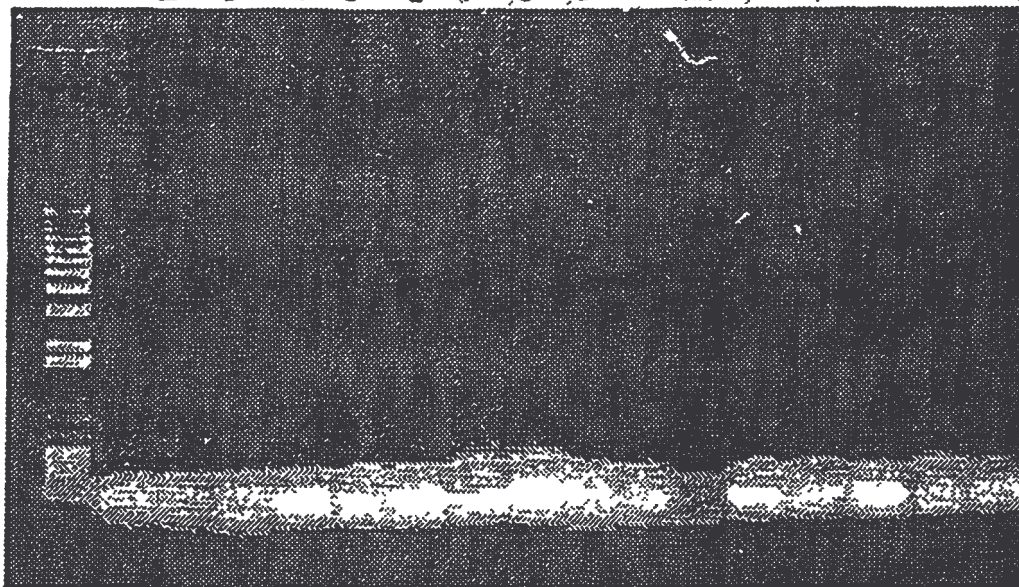
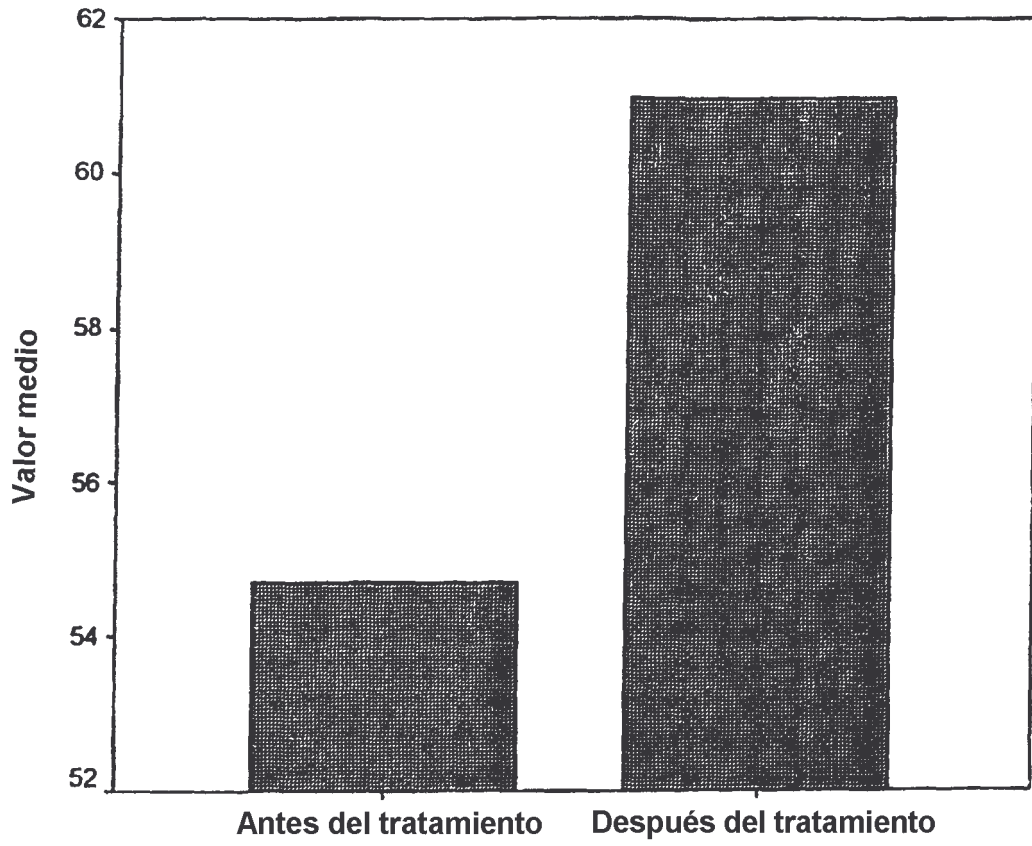


Figura 15



Síntomas

Figura 16

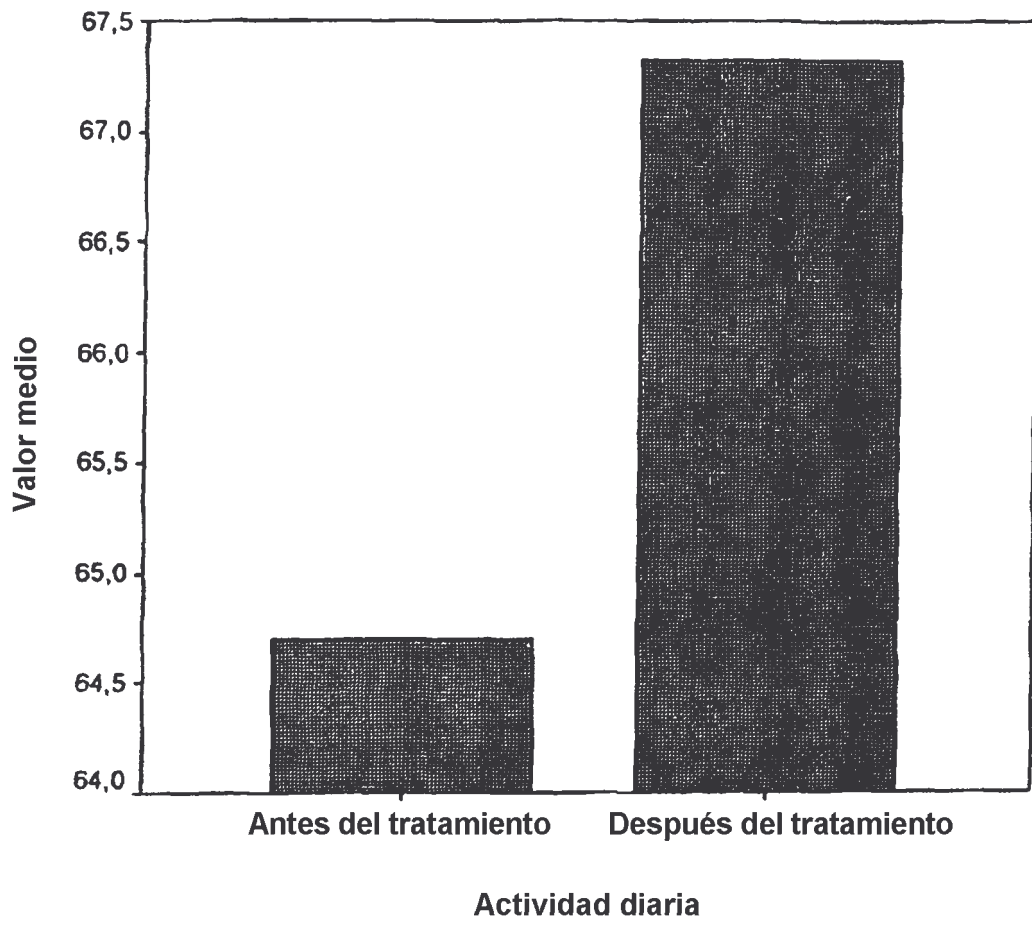


Figura 17

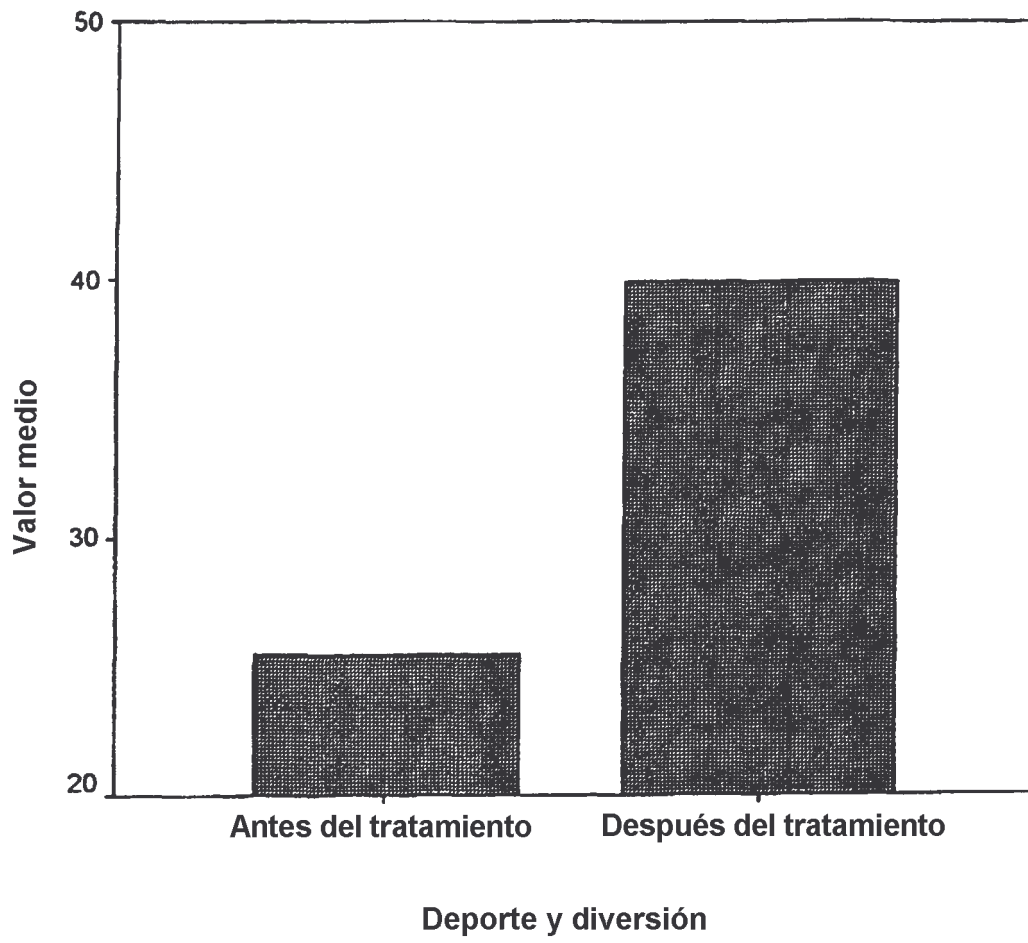


Figura 18

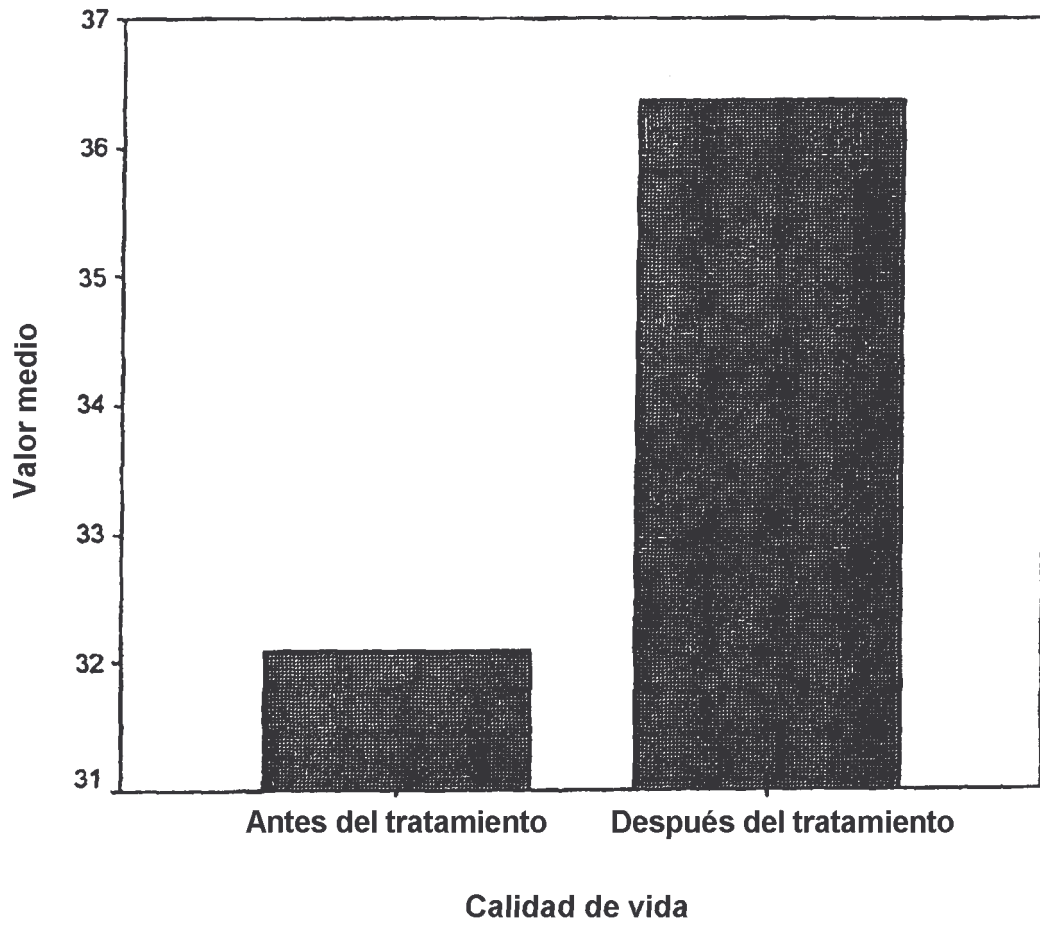


Figura 19

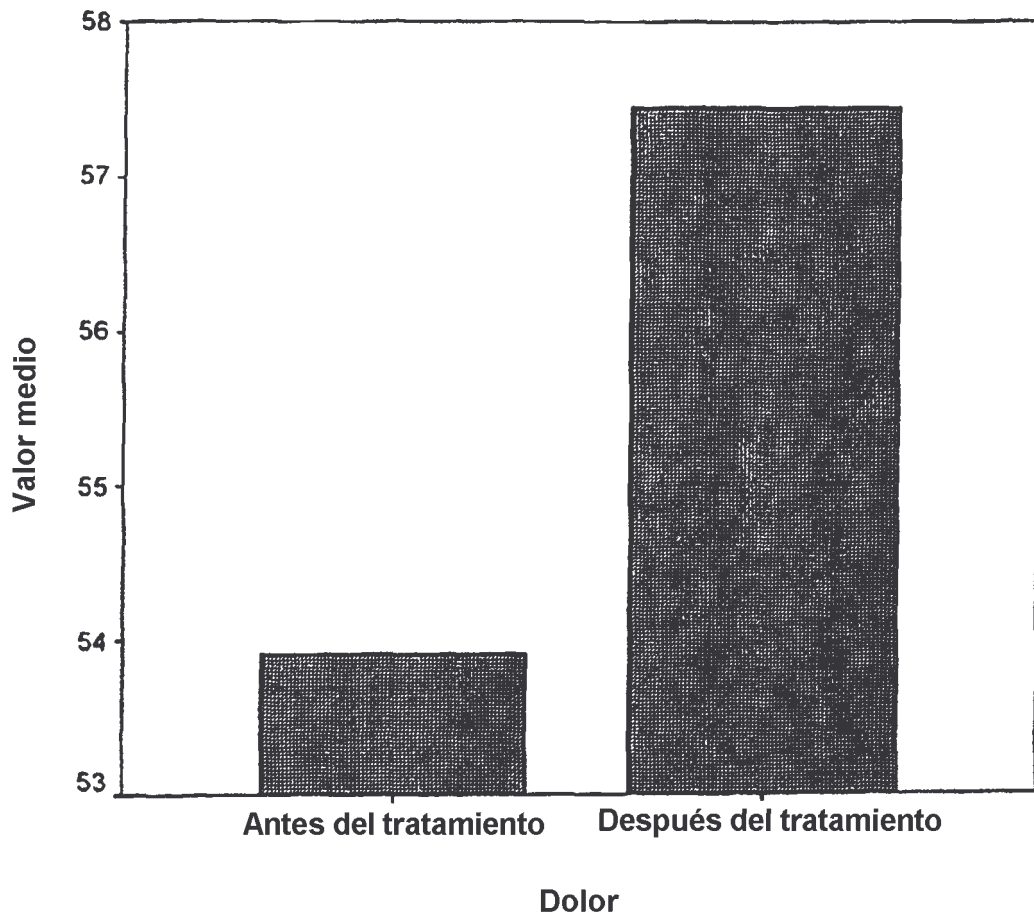


Figura 20

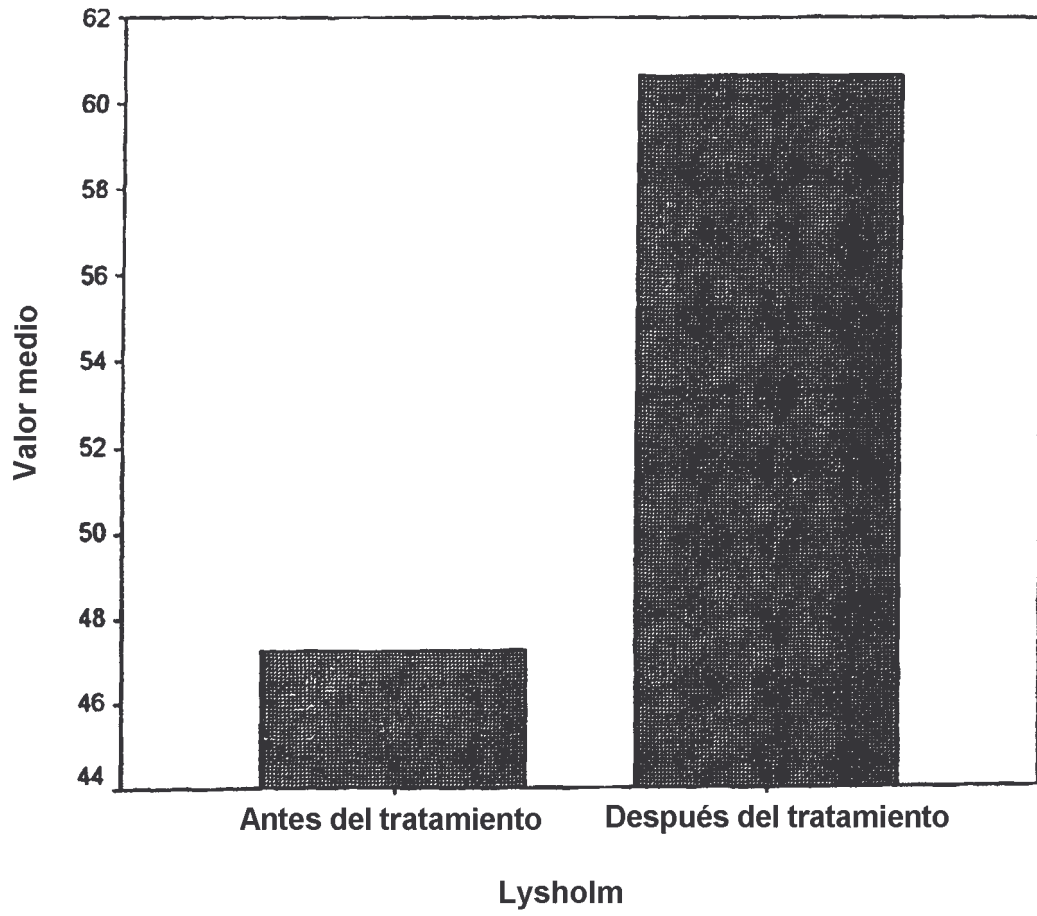


Figura 21