

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

Estudio Inmunoquímico del Acoplamiento de FPS.
(Polisacaridos de Freeman) Derivados de Salmone-
lla Durham Salvaje y Convertida por el Fago
1-37, a Lisina y BSA.

T E S I S
Que Para Obtener el Título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P r e s e n t a

María del Carmen García de León Méndez

México, D. F.

Junio de 1978



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS TESIS 1928
ABO M. T. 128
FECHA 182 176
PROC _____
s _____



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE	Q.F.B. MAGDALENA ACOSTA SEGURA
VOCAL	DR. SALVADOR MARTIN SOSA
SECRETARIO	DRA. MA. DOLORES LASTRA
1er. SUPLENTE	DR. LIBRADO ORTIZ ORTIZ
2o. SUPLENTE	DR. RAFAEL SANTANA

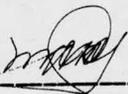
SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: LABORATORIO DE
INMUNOQUIMICA. HOSPITAL INFANTIL DE
MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

SUSTENTANTE:

MA. DEL CARMEN GARCIA DE LEON

FIRMA: _____



ASESOR: DRA. MA. DOLORES LASTRA
ASESOR TECNICO DR. ARMANDO ISIBASI A.

A la memoria del

ING. LUIS GARCIA DE LEON R.

A MIS PADRES .

A MIS HERMANOS .

A MI ESPOSO .

AGRADECIMIENTOS:

AL DR. ARMANDO ISIBASI A.,
por su asesoría técnica y su
colaboración en la redacción
del manuscrito.

AL DR. JESUS KUMATE R.,
Jefe del Laboratorio de Inmunología del
Hospital Infantil de México,
quien me dio la oportunidad de trabajar en
su Laboratorio y tuvo siempre la palabra
de estímulo oportuna y el juicio crítico
que permitió completar este estudio.

A LA DRA. MA. DOLORES LASTRA DE DEPA
y AL DR. ANTONIO RAMIREZ VIDALS
por su desinteresada ayuda.

I N D I C E

	Pág.
OBJETIVO	1
INTRODUCCION	5
MATERIAL Y METODOS	9
RESULTADOS	28
DISCUSION	54
CONCLUSIONES	63
ABREVIATURAS	69

I. OBJETIVO.

Por los métodos usuales, la determinación de estructuras químicas de antígenos polisacáridicos, obtenidos por el método de Freeman (4), implican una serie de pasos tediosos y prolongados. Se piensa que a través de inmunoabsorbentes, se evitarán estos procedimientos, en base a la capacidad que tienen los anticuerpos fijados en una columna de Sepharosa 4B, de atrapar exclusivamente los determinantes antigénicos específicos, los cuales una vez eluidos y concentrados, permiten trabajar directamente sobre ellos y por lo tanto, la separación de moléculas específicas e inespecíficas se hace innecesaria.

Los primeros intentos que se hicieron para aplicar este método (5), fueron muy prometedores ya que, los anticuerpos de caballo dirigidos contra Salmonella durham, al ser unidos a Sepharosa 4B, y colocados en una columna de vidrio reaccionaron con los determinantes antigénicos específicos derivados del FPS (Polisacárido de Freeman) total de la misma salmonela.

Esto se comprobó con curvas de precipitación cuantitativa, ya que la fracción unida y eluida con solución amortiguadora Gli-HCl pH 2.2, dió títulos precipitantes (en su equi-

valencia) más altos que los obtenidos con el polisacárido total; resultados que corroboraron:

1. La heterogeneidad de los sacáridos obtenidos por el método mencionado.
2. La capacidad específica del inmunoadsorbente al separar moléculas químicas con actividad biológica definida, de moléculas inespecíficas.

El siguiente paso a seguir, fue el pasar por la misma columna, ya no el polisacárido total, sino un hidrolizado parcial, que de acuerdo a una cinética bien definida diera el tiempo, la concentración exacta y el tipo de ácido que permitiera la obtención de moléculas que dieran una mayor inhibición del suero inmune de caballo empleado en la preparación del inmunoadsorbente y el polisacárido purificado, obtenido a través del mismo; este fue el que se obtuvo con hidrólisis por ácido sulfúrico 0.5 moles/litro durante 30 minutos.

Los resultados de esta experiencia fueron contrarios a lo que en un principio se esperaba, debido a que las moléculas más pequeñas (y por lo tanto más específicas) en su reacción con el anticuerpo, fueron desplazadas, por las de mayor

tamaño, por lo que sólo éstas se unieron, mientras que las --
otras, salieron en la elución con PBS.

Si bien las moléculas pequeñas no se unieron, aumentaron casi al doble la inhibición del hidrolizado total el rendimiento de éstas fue muy pequeño y el estudio químico de sus --
estructuras, a pesar de ser específicas proporcionó la obtención de moléculas específicas en forma inespecífica y éste no fue el fin primario del trabajo.

Ante estas circunstancias nos propusimos por medio --
de inmunoabsorbentes lo siguiente:

1. Obtener anticuerpos menos heterogéneos y dirigidos --
contra cada uno de los determinantes específicos de Salmonella durham G⁺ (factores 1, 13, 23, 3
y 37).
2. Una vez obtenidos éstos, preparar un nuevo inmuno--
absorbente con cada uno de los anticuerpos obtenidos en el inciso '1', y así, pasar el hidrolizado parcial, retener en la columna los determinantes --
específicos de cada factor y estudiarlos químicamente.

En el presente trabajo se dan a conocer los ensayos -
preliminares, realizados para resolver el primer punto.

II. BREVE RESUMEN SOBRE LOS ANTIGENOS 'O' DE SALMONELLA.

Salmonella son bacterias Gram negativas de la familia Enterobacteriaceae. Como todas las células, poseen en su superficie numerosos antígenos; el antígeno 'O' está ligado a la presencia de un complejo proteina-lípido-polisacárido situado sobre la pared bacteriana.

A. Clasificación de las salmonelas de acuerdo a su Antígeno 'O'.

La posibilidad de obtener sueros anti-O por medio de la inyección de bacterias (muertas por calor) a conejos, ha permitido clasificar las salmonelas en base a sus propiedades inmunológicas; esta clasificación es la de Kauffman-White (1). Los factores antigénicos 'O' se detectan, por medio de la aglutinación homóloga y cruzada con sueros absorbidos. Los factores 'O' identificados en esta forma se representan por medio de números arábigos. Hasta la fecha se han identificado más de 1000 serotipos.

Ciertos factores 'O' son comunes a varios serotipos -

y permiten definir grupos serológicos caracterizados por la presencia de un factor 'O' dado; de este modo el factor 2 define al grupo A; el 3 al grupo E, etc.. Por el contrario ciertos factores pueden ser comunes a numerosos grupos, por ejemplo los factores 1 y 12.

B. Relaciones entre los polisacáridos específicos y los factores detectados serológicamente.

El antígeno somático 'O', es un complejo proteína-lípido-polisacárido. El polisacárido 'O' específico está formado de una región interna llamado núcleo común a todas las salmonelas y de una cadena lateral que representa la región 'O' específica que se puede esquematizar de la siguiente forma:

El núcleo aparentemente es el mismo en todas las salmonelas, está compuesto de 5 azúcares: cetodesoxioctanato, heptosa, glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina.

La cadena específica 'O', está constituida por la repetición de n unidades oligosacáridicas idénticas; cada unidad, está compuesta de 4 o 5 azúcares que varían según los grupos.

En el cuadro 1 se observan algunas unidades oligosacá

CUADRO N° 1

UNIDADES ESPECIFICAS DE POLISACARIDOS DE ALGUNAS
SALMONELLA (2)

GRUPO	UNIDAD BIOLÓGICA DE BASE
<p><u>A</u></p> <p>S. paratyphi A 1, 2, 12</p>	$\rightarrow [2-\overset{\alpha \text{ par}}{\downarrow 1,3} \text{ man}-1,4-\text{ram}-1,3-\overset{\alpha \text{ glc}}{\downarrow 1,6} \text{ gal}-1] \rightarrow$
<p>S. durazzo A 2, 12</p>	$\rightarrow [2-\overset{\text{par}}{\downarrow 1,3} \text{ man}-1,4-\text{ram}-1,3-\overset{\text{glc}}{\downarrow 1,4} \text{ gal}-2] \rightarrow$
<p><u>B</u></p> <p>S. typhimurum 4, 5, 12</p>	$\rightarrow [2-\overset{\alpha \text{ be}}{\downarrow 1,3} \text{ man}-1,4-\text{ram}-1,3-\overset{\text{glc}}{\downarrow 1,4} \text{ gal}-1] \rightarrow$
<p><u>D</u></p> <p>S. typhi 9, 12</p>	$\rightarrow [2-\overset{\text{trv}}{\downarrow 1,3} \text{ man}-1,4-\text{ram}-1,3-\overset{\text{glc}}{\downarrow 1,4} \text{ gal}-1] \rightarrow$
<p><u>E</u></p> <p>S. senftenberg 1, 13, 19</p>	$\rightarrow [6-\overset{\alpha \text{ glc}}{\downarrow 1,6} \text{ man}-1,4-\text{ram}-1,3-\text{gal}-1] \rightarrow$

rídicas específicas. El estudio del polisacárido específico, -- por medio de técnicas inmunológicas y químicas, permite identificar en las unidades oligosacarídicas; la entidad responsable de la especificidad de los factores.

Cuando un azúcar ocupa una posición terminal sobre la cadena lateral o sobre la principal, juega generalmente un papel preferente en (3) la especificidad del factor antigénico, es decir, para un factor dado, este azúcar representa el mejor inhibidor de la reacción de precipitación del polisacárido (portador del factor) con el anticuerpo correspondiente. A este azúcar se le llama, inmunodominante.

Sin embargo, no todos esos azúcares terminales, no reductores, son azúcares inmunodominantes, pues cada uno de los azúcares de la cadena pueden eventualmente jugar ese papel.

MATERIAL Y METODOS

I. MATERIAL.

Sueros inmunes.

a) En el laboratorio de Inmunoquímica del Hospital Infantil de México, donde se realizó esta tesis, se disponía de los sueros anti-polisacárido utilizados, obtenidos después de la inyección de una suspensión de Salmonella durhan muerta por calentamiento siguiendo el método de Staub y cols. (6).

b) Suero anti-BSA (Seroalbúmina bovina), obtenido en conejos (7), según el esquema de inmunización siguiente:

El antígeno administrado fue:

5 ml de Adyuvante de Freund Completo

0.1 ml de solución de BSA al 5%

Se tomó una muestra de suero previamente a la inmunización.

Semanas	vía de inoculación	cantidad administrada	sitio de inoculación
1a.	subcutánea	1 ml	plantar
2a.	"	"	"
3a.	"	"	"
4a.	"	"	"

Reposo de 8 días

9o. día Sangrado del animal para probar los anticuerpos.

Los sueros se conservaron en ampollitas estériles a 4°C. En el momento de utilizarlos se filtraron y se les agregó azida de sodio con el fin de evitar el desarrollo de contaminantes.

Polisacáridos

Los polisacáridos derivados de S. durham salvaje (13, 23, 36) y S. durham convertida por el fago 1, 37 (1, 13, 23, 36, 37), fueron extraídos de acuerdo a la técnica de Freeman-Staub (8).

II. METODOS.

La inmunodifusión radial (9), la inmunolectroforesis y contraelectroforesis, se llevaron a cabo en placas de vidrio, sobre las que se depositó Agarosa (Sigma) al 1% en solución de Barbital pH 8.2, 0.025 M, las placas fueron previamente lavadas con detergente, agua y acetona.

Para la inmunodifusión radial el diámetro de los orificios osciló entre los 2 y 3 mm según la muestra, y la distancia entre cada uno de ellos (los que contenían el Ag y el Ac respectivamente) fue de 3 mm.

Las muestras se emplearon en las siguientes condiciones:

Sueros inmunes --- sin diluir
Antígenos controles --- 100 μ g/ml
Muestras liofilizadas --- 10, 100 y 1000 μ g/ml
Soluciones de concentración no conocida - con dil 1:10
y sin diluir

Las inmunolectroforesis (10) que se hicieron, variaron en lo que respecta a los Ag y Ac usados, pero en relación al tiempo y voltaje en todos los casos fueron de aproximadamente 30 y 60 mins., con corriente constante de 8mA por muestra. La cantidad de muestras aplicadas en cada placa varió desde 1 hasta 6. El diámetro del orificio, donde se aplicaron las muestras que fueron corridas, fue de 2 mm. Los canales donde se colocó el anticuerpo para revelar el antígeno corrido, se encontraban a una distancia de 5 mm, entre cada pozo, con una anchura de 2 mm y largo de 5 cm.

El revelado de ambas pruebas, se leyó a 24 hrs y 48 hrs. Para poder conservar las placas, una vez leídas, fueron lavadas con solución salina isotónica, con 3 a 5 cambios, secadas por deshidratación al calor, y coloreadas con negro de amido según técnica descrita (7).

Para la contrainmunolectroforesis (11) se empleó la misma metodología, salvo, desde luego, en lo que respecta a la colocación del antígeno y el anticuerpo pues de acuerdo a la técnica y su principio éste último siempre se coloca en el ánodo.

Curva de Precipitación cuantitativa.

A. Teoría de la precipitación. La precipitación es una de las manifestaciones de la reacción Ag-Ac, la teoría de Marrack (12) explica la precipitación a través de la formación de una red.

Las moléculas de antígeno y de anticuerpos presentan una complementaridad de estructura que conduce a la formación de un complejo estable.

La molécula de antígeno posee varios sitios antigénicos diferentes.

La molécula de anticuerpo posee de 2 a 10 sitios de acuerdo a la inmunoglobulina de que se trate. Cada molécula de antígeno se une a varias moléculas de anticuerpo que a su vez, se unen a otras moléculas de antígeno, formándose así una red,

que precipitará cuando los grupos hidrófobos no sean suficientes para mantenerlos en solución.

Precipitación Cualitativa. Prueba del Anillo.

Principio. En un microtubo se sobreponen el anticuerpo (inmunosuero) y el antígeno, formándose en la interfase un fenómeno de difusión. Cuando el antígeno y el anticuerpo, se encuentran en concentraciones convenientes, se forma en la interfase un disco de precipitación.

Por este método se determina rápidamente, si un inmunosuero dado, reacciona con el antígeno correspondiente.

El tiempo de formación del disco varía según los sistemas y va desde unos minutos hasta 2 o 3 horas.

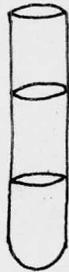
En la práctica generalmente se introduce en un tubo el inmunosuero con un capilar, después se coloca con sumo cuidado con la ayuda de otro capilar, el antígeno en solución salina isotónica. La concentración del antígeno es de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Estudio Cuantitativo de la precipitación en medio líquido.

Principio. El método de Heidelberg y Kendall (13) utiliza un volumen constante de suero y cantidades crecientes de -

FIGURA N° 2

ESTUDIO DE LOS SOBRENADANTES POR EL METODO DE PRECIPITACION
O PRUEBA DEL ANILLO



SOBRENADANTE

INMUNOSUERO

EXCESO DE ANTICUERPO



SOBRENADANTE

INMUNOSUERO

EQUIVALENCIA



ANTIGENO

SOBRENADANTE



ANTIGENO

SOBRENADANTE

EXCESO DE ANTIGENO



antígeno. Una vez terminada la reacción, el precipitado es lavado varias veces y cuantificado por el método de Folin (14).

Como los antígenos polisacáridicos no contienen grupos tirosina, la cantidad obtenida nos permite saber la concentración de anticuerpos presentes en el precipitado.

Para nuestro trabajo empleamos tubos de 13 x 100 de la reacción, se realizó con cantidades constantes de inmunosue-ro (1) y cantidades de antígeno que fueron desde 1 mg hasta 100 μ g. En todos los casos el volúmen se llevó a una cantidad -- constante con solución salina, los tubos se agitaron, taparon y colocaron a 4°C durante 48 horas.

Al transcurrir este tiempo se centrifugó durante 30 -- min. a 3500 rpm en centrifuga refrigerada. Los sobrenadantes fueron estudiados por el método del anillo, con el fin de establecer la zona de equivalencia (fig 2). El precipitado se lavó -- dos veces con solución salina. Se cuantificaron proteínas por Folin (14) y se trazaron curvas de densidad óptica en función -- de la concentración de Ag.

Afinidad cromatográfica.

Es un método de purificación que ha probado ser parti

cularmente útil en el aislamiento de proteínas y otras sustancias biológicas (15).

La afinidad cromatográfica también llamada, absorción bioespecífica, es un método en el cual intervienen dos moléculas, una de ellas es un ligando unido a un soporte inerte y la otra, una macromolécula afín, las que al unirse, forman complejos estables. La unión del ligando al soporte (insoluble en agua) produce la resina de afinidad.

Para aislar una sustancia por afinidad cromatográfica, se emplea una columna de cromatografía empacada con la resina de afinidad apropiada, sobre la cual se hace pasar una solución acuosa de tal sustancia, ésta es retenida en la columna por formación de complejos con el acarreador unido al ligamento o efector, mientras que las moléculas no afines al efector, presentes en la solución pasan a través de la columna libremente.

Una vez que la columna ha sido lavada para retirar los contaminantes, el complejo se separa por cambio de medio cromatográfico, y de este modo la sustancia en cuestión es obtenida en forma pura, en el líquido eluido de la columna.

En este trabajo se emplearon dos tipos de soporte; el primero es un derivado de Agarosa (Sepharosa 4B) y el segundo un derivado de pliacrilamida (Biogel P 300).

Estos geles para ser empleados requieren de un tratamiento previo:

Activación de Sepharosa 4B con CNBr según método -- descrito por Axen y Porath (16):

500 ml de Sepharosa 4B suspendidos en 1500 ml de -- agua destilada. Se colocan en un matraz que contiene, 50 g de CNBr. La mezcla de reacción se lleva a pH 12.0 con NaOH y se mantiene unos minutos (12 aprox.) a ese pH, hasta disolución -- completa del bromuro. Se lava varias veces hasta que el agua -- de lavado tenga el mismo pH del agua destilada empleada, el -- gel activado puede ser almacenado a 4°C o emplearse inmediata mente.

En nuestro caso sólo fueron activados 25 ml de Sepharosa 4B, el resto de la Sepharosa empleada a lo largo del tra-- bajo, se obtuvo comercialmente en forma activada (Sigma).

La Sepharosa activada se centrifugó y pesó antes del -- acoplamiento, para mantener una relación en peso con el polisa

cárido con el cual se unió. La relación se mantuvo entre 1:30 y 1:60 con respecto a la cantidad empleada de polisacárido.

Una vez pesadas las cantidades necesarias de uno y otro reactivo, se colocan en un vaso de precipitados y se dejan agitando durante una noche a 4°C. Previamente cada reactivo, deberá ser dializado contra un amortiguador apropiado (el mismo para los dos) con el fin de que se encuentren al mismo pH. El amortiguador utilizado fue NaHCO_3 pH 9.5 0.1 moles/litro. Al cabo de una noche de agitación, el gel es montado en una columna de cromatografía, sobre la cual, se hace circular:

- 1o. Solución amortiguadora salina de fosfatos pH 7.4 0.017 moles/litro con el fin de lavar la columna, esto es, -- eliminar de la columna las moléculas de ligando que no hayan reaccionado con el soporte.
- 2o. 1 ml de suero anti FPS G^+ , y FPS G^- , según el ensayo de que se trate, éste se deja circular a través de la columna sin permitir que salga de ella, con el fin de que todo el adsorbente tenga contacto con él y pueda de esta manera retener los Ac que se desea separar primeramente. El tiempo de permanencia del suero va rió de 30 min. hasta 48 hrs.

- 3o. PBS 0.017 moles/litro pH 7.4 con el fin de eliminar, -- después de la incubación del suero, las proteínas séricas y demás contaminantes presentes en el suero específico e inespecíficas para el inmunoabsorbente.
- 4o. Amortiguador Gli-HCl 0.2 moles/litro pH 2.2 para romper los enlaces débiles formados entre el Ac específico y el Ag acoplados al soporte inerte.

Los cambios de amortiguador a lo largo de toda la cromatografía son determinados por las lecturas espectrofotométricas hechas a las fracciones obtenidas en cada paso, éstas se -- realizaron a $E = 500$ nm Folin (14) y $E = 280$ (uv) cuando se trataba de muestras portadoras de proteínas y con $E = 625$ nm (Antrona (17) cuando lo que se buscaba era polisacárido.

Activación de Biogel P 300 según método descrito por Avrameas (18).

250 ml de solución de glutaraldehído al 6% (220 ml de -- amortiguador fosfato 30 ml de glutaraldehído al 50%) 50 ml -- Biogel P - 300; incubar a 37°C toda la noche. Al día siguiente -- se lava exhaustivamente hasta eliminar el glutaraldehído. Con-- servarlo a 4°C.

En nuestro caso empleamos 25 ml de Biogel y 125 ml de solución de glutaraldehído; de esta muestra se tomaron alícuotas para las columnas montadas. La cromatografía en este caso se efectuó con la misma metodología empleada para Sepharosa 4B.

Cromatografía en Sephadex G-100.

Este método se empleó en el trabajo, para separar moléculas en base a su peso molecular; específicamente polisacáridos (40-50 000); BSA (70 000) y el complejo BSA-Polisacárido (110-120 000) (19).

1. Activación de FPS G⁻ con m-peryodato de sodio y acoplamiento a lisina (20).

I.- A 20 mg de FPS G⁻, se le adicionaron 46 mg de lisina, 1 mg de m-peryodato de sodio y 38 mg de borohidruro de sodio, la mezcla se agitó vigorosamente, y al cabo de una hora de reposo, se dializó contra una solución de citrato 0.15 moles/litro pH 8.0.

La solución dializada se dividió en dos partes iguales y se acoplaron respectivamente a Sepharosa 4B y a Biogel P-300,

en proporción 30:1. Se montaron columnas de 1 ml (3 mm de diámetro por 15 cm de largo). A cada una se le adicionó 1 ml de suero hiperimmune anti FPS G⁻. La cromatografía de afinidad se siguió según la técnica mencionada (pág. 15).

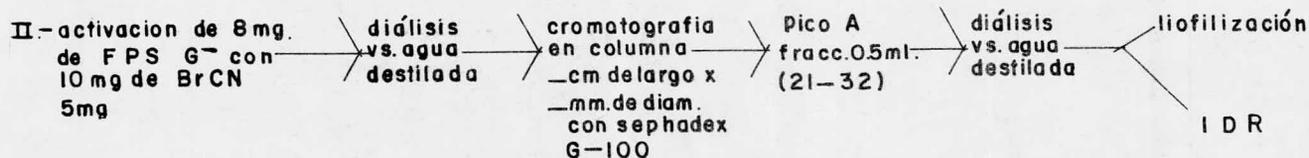
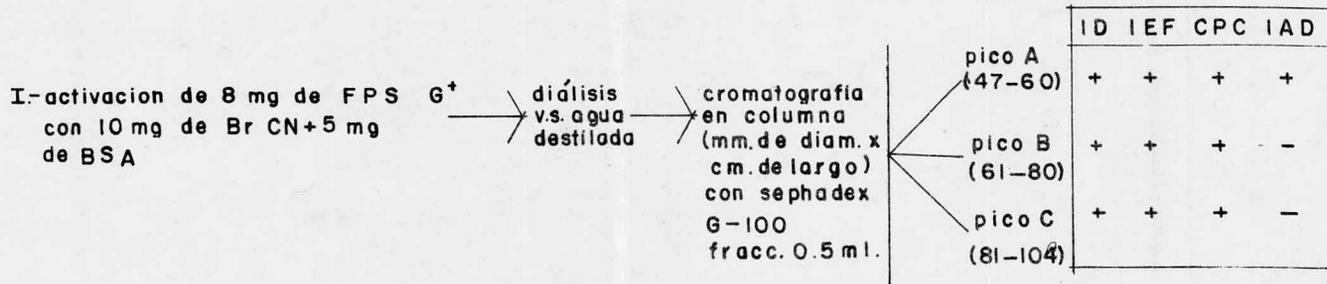
II.- La técnica anterior se repitió en las mismas condiciones, sólo que con cantidades mayores de reactivos, la columna montada en este caso de 5 ml (5 mm de diámetro y 35 cm de largo).

2. Activación de FPS G⁺ con BrCN y acoplamiento a lisina (21).

I.- A 2 ml de una solución de 15 mg/ml de FPS G⁻, en agua, se le adicionaron 0.4 ml de una solución de BrCN a 25 mg/ml en agua, se dejó reposar 6 minutos a temperatura ambiente, al cabo de los cuales se llevó a pH NaHCO₃ 1.0 moles/litro y se le adicionaron 0.35 ml de NaHCO₃ 1.0 moles/litro que contienen 8 a 10 mg de lisina; se mantuvo de 2 a 4 horas a temperatura ambiente, se dializaron vs PBS 0.017 moles/litro pH 7.4 a 4°C durante una noche.

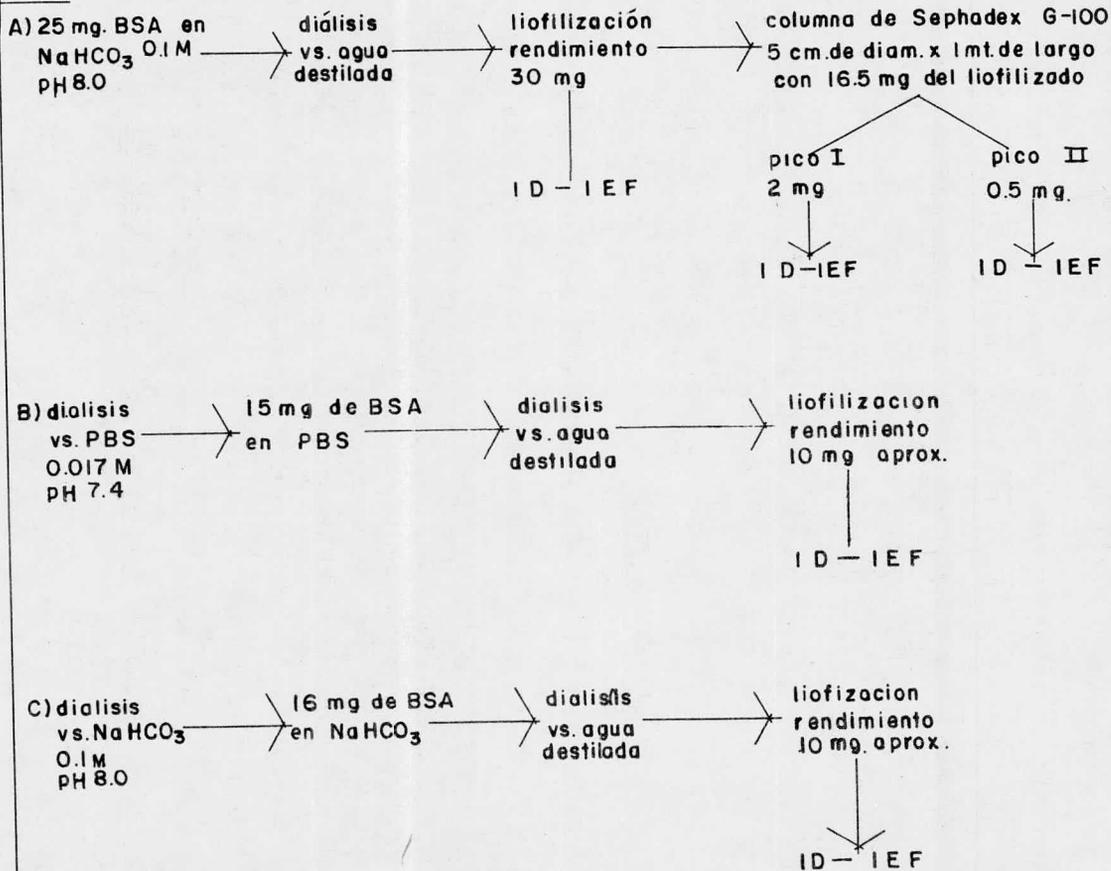
Con la mezcla de reacción obtenida, después de la dialisis, se montó una columna de inmunoadsorbente, son Sepharo-

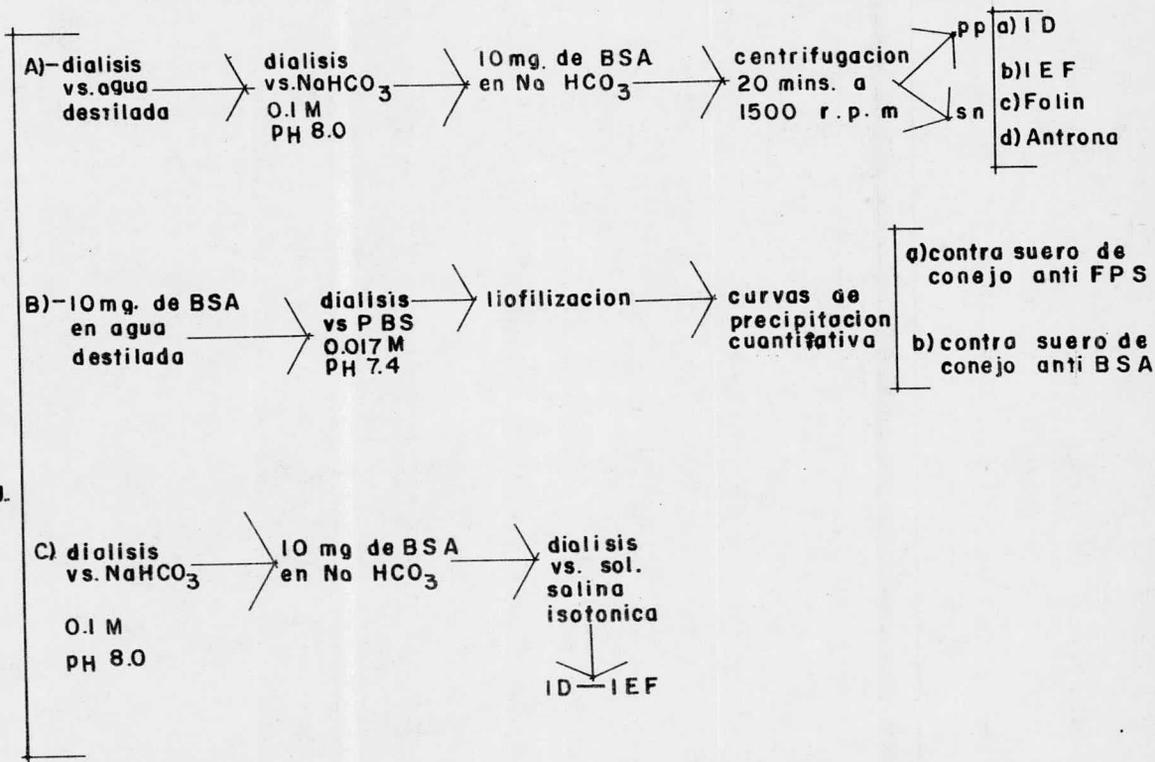
3.-ACTIVACION DE FPS con BrCN y ACOPLAMIENTO a BSA



CPC: anti FPS G^+

III-Activacion de
40 mg. de FPS G*
con BrCN (2.6gr)
(se divide en 3
porciones)





IV- activacion de 120mg. de FPS G- con Br CN (se divide en tres porciones)

Abreviaturas:

ID — inmunodifusion radial Ouchterlony
 IEF — inmunoelectroforesis
 CPC — curva de precipitacion cuantitativa

sa 4B activada con BrCN comercial (Sigma), previamente hidratada con agua y dializada contra solución de NaHCO_3 0.1 moles/litro pH 9.5, este último se realizó con el polisacárido tratado, la proporción para el acoplamiento fue de 60:1; la columna fue de 10 ml (10 mm de diámetro y 35 cm de largo).

3. Activación de FPS G^+ con m-peryodato de sodio y acoplamiento a BSA (20).

I.- 20 mg de FPS G^+ , se disolvieron en 2.5 ml de una solución de NaIO_4 0.1 moles/litro, se dejó en reposo durante 20 minutos a temperatura del cuarto y en la oscuridad. Al cabo de este tiempo, se le adicionaron 0.15 ml de etilén glicol 1.0 moles/litro para detener la reacción se dejó actuar durante 5 minutos e inmediatamente después, se mezcló con 140 mg de BSA disueltos en 5 ml de agua destilada, alcalinizada con KCO_3 al 5%.

La mezcla se mantuvo en agitación constante y a pH 9.0-9.5 con KCO_3 al 5%, a temperatura del cuarto, durante 2 hr y a 4°C durante 18 hrs. Al término de este tiempo se colocó en diálisis exhaustiva frente a solución salina.

La muestra obtenida después de este tratamiento se pro

bó en inmunodifusión, e inmunolectroforesis frente a sueros --
inmunes específicos.

II.- La técnica anterior se repitió con las siguientes varia-
ciones:

Se emplearon 5 muestras de 5 mg de FPS G , las que
se hicieron reacción con 15 mg de BSA y 20 mg de Na -
BH₄, cada una.

El tiempo de oxidación original (20') fue reemplazado -
por 0', 1', 2', 5', 10', respectivamente para cada muestra. Los
ensayos fueron realizados en forma simultánea; el ensayo com-
pleto fue repetido una vez más.

4. Activación de FPS G⁻ y acoplamiento a través de diazoación
a BSA (22).

Este método está dividido en tres partes: preparación -
del éter formado por los radicales oxhidrilolibres en el polisa-
cárido y una molécula factible de diazoar; reducción de esta mo-
lécula para obtener amina primaria aromática, la substancia --
pleada en este caso es el bromuro de p-nitro bencilo; y la terce-
ra parte, la diazoación propiamente dicha por medio de la cual-
se une la protefna al polisacárido.

La técnica se realizó en idénticas condiciones a las -- reportadas por el autor (22), únicamente las concentraciones -- de los reactivos fueron diferentes, pero siempre en proporción a las mencionadas y en relación estequiométrica al polisacárido, que en este caso fue FPS G⁻.

Se realizaron 3 ensayos:

- I.- Con 10 mg de polisacáridos, empleando solamente la -- tercera parte de la técnica (diazoación y acoplamiento a BSA). La muestra resultante se probó con sueros inmunes específicos en inmunodifusión e inmuno-electroforesis. La cantidad de BSA empleada fue de 8 mg.
- II.- Con 30 mg de polisacárido y 141 mg de bromuro de -- p-nitrobencilo, (23), acoplados a 24 mg de BSA, la muestra se dializó finalmente contra solución fisiológica de NaCl, y se probó con sueros específicos en inmunodifusión y electroforesis.
- III.- Con 5 mg de polisacárido y 23.5 mg de bromuro de -- p-nitrobencilo, la reacción fue seguida desde su inicio con inmunodifusión y se detuvo en el momento en que no apareció banda de precipitado en el gel, frente a -- un suero inmune específico de conejo contra FPS G⁻.

R E S U L T A D O S

1. Activación de FPS G⁻ con m-peryodato de sodio y acoplamiento a Lisina.

Los ensayos preliminares realizados con activación por m-peryodato de sodio del polisacárido, el cual fue acoplado a lisina y directamente puesto a reaccionar con Sepharosa 4B (pág. 21), se muestran en las figuras 3, 4 y 5.

2. Activación de FPS G⁺ con BrCN y acoplamiento a Lisina (21).

El resultado de esta activación del polisacárido, se muestra en la fig. 6, la cual es el perfil cromatográfico de la elución de la columna de inmunoabsorbentes preparados con Sepharosa 4B y polisacárido activado con BrCN.

3. Activación de FPS con BrCN y acoplamiento a BSA.

I.- Los resultados obtenidos por esta primera variante del procedimiento general (pág. 22), demuestran a través de la cromatografía en columna de Sephadex G-100, la presencia de tres picos (fig. 7).

El pico A, a la IDR e IEF (fig. 8), fue negativo y la CPC, muestra aparentemente, que trabajamos en exceso de Ag polisacárido.

fig 3

Inmunoabsorbente.

Ag: FPS G⁻ - Lts - Sepharosa 4 B

Ac: Suero de conejo anti FPS G⁻

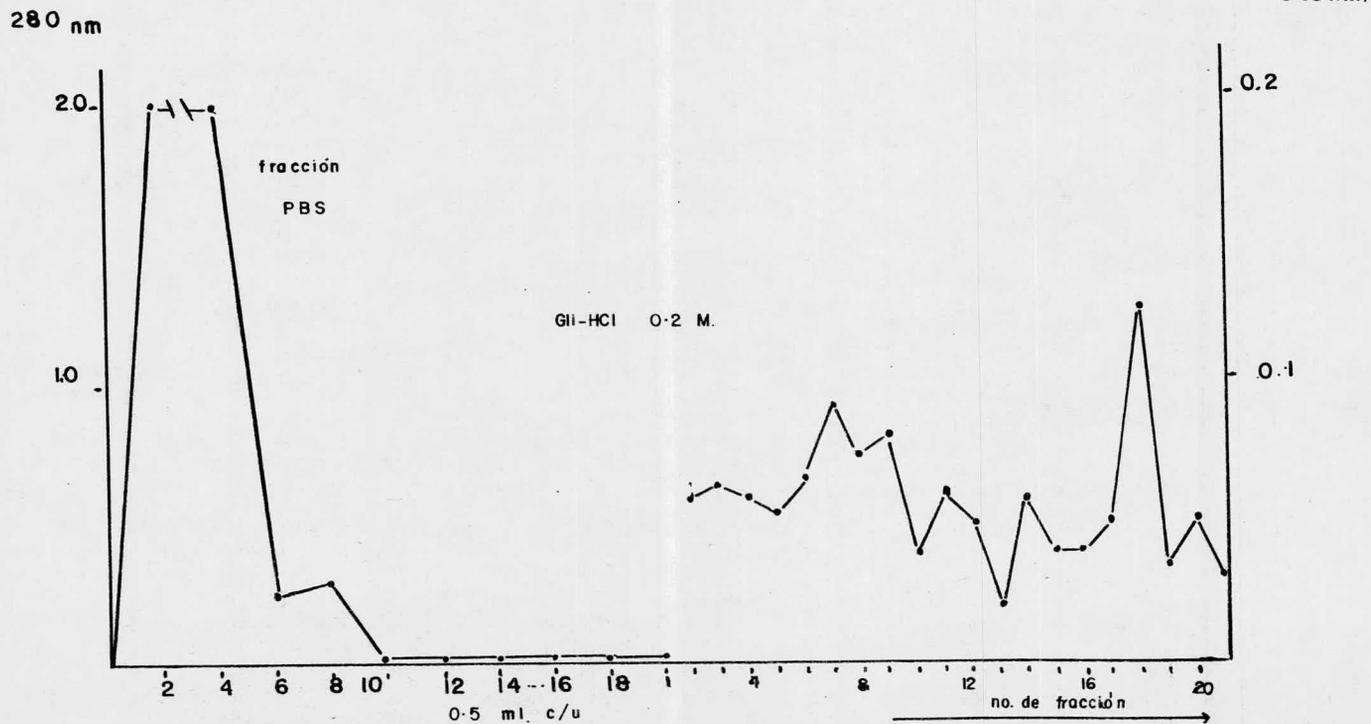


fig 4.

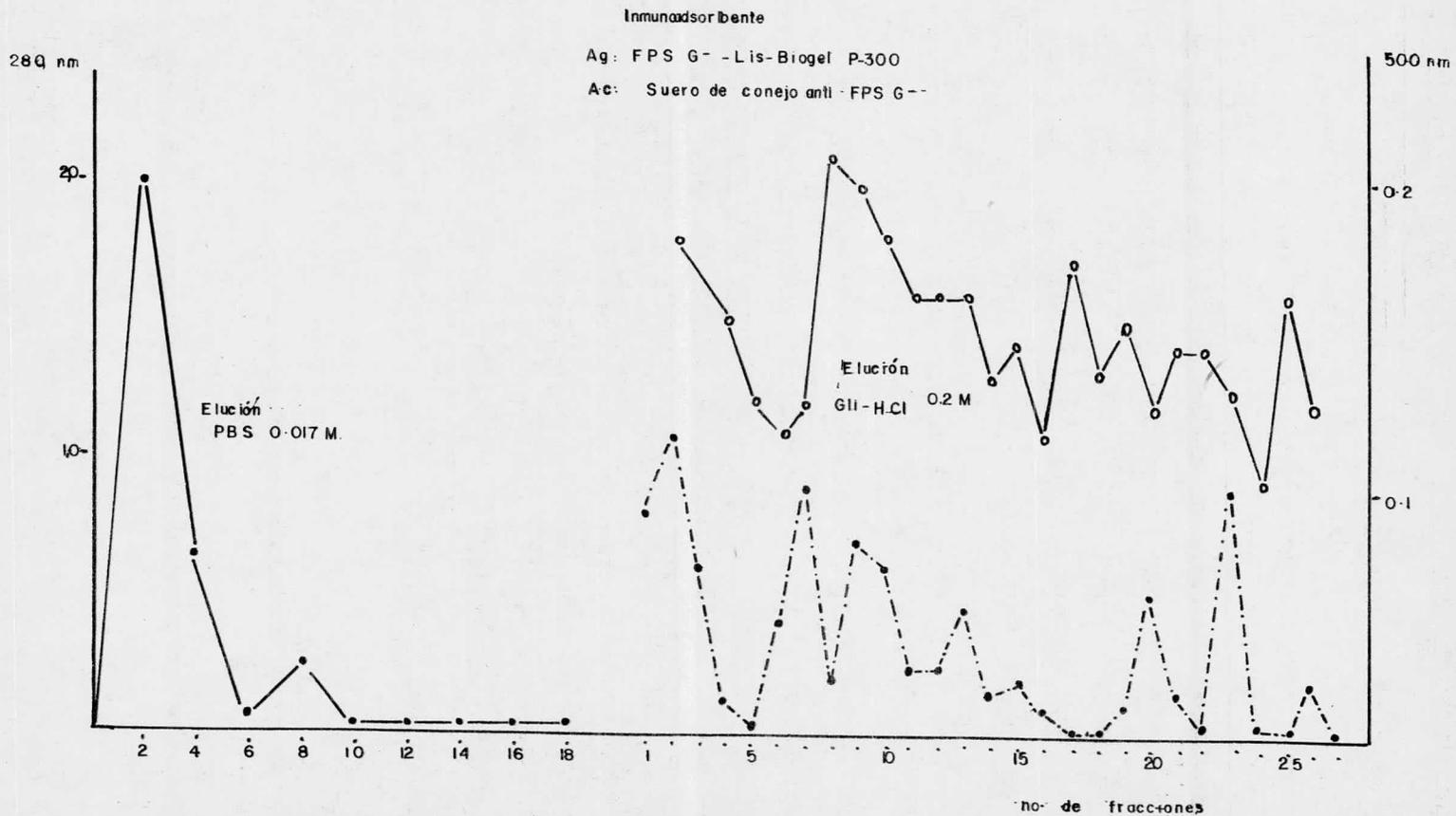


fig 5

Inmunoabsorbente

Ag: FPS G- - Lis - S epharosa 4 B

Ac: S uero anti FPS G-

Elucion: G li - HCl 0.2 M

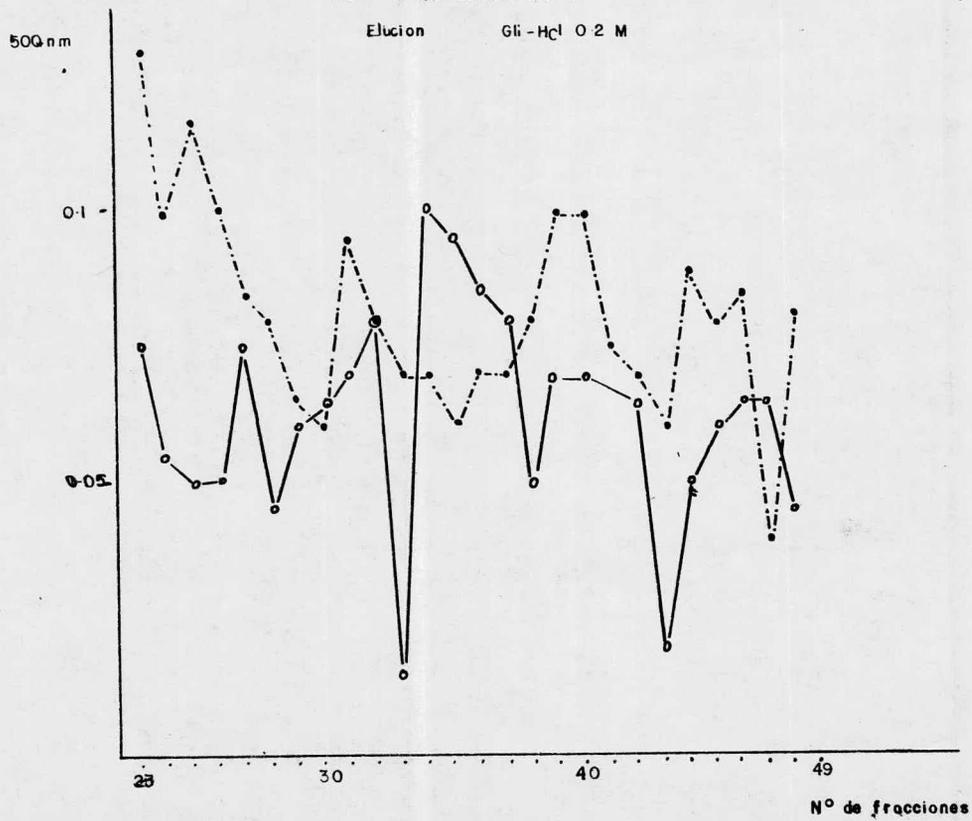


fig. 6

Inmunoadsorbente

Ag: FPS G+ Lis Sepharosa 4 B

Ac suero de conejo anti FPS G+

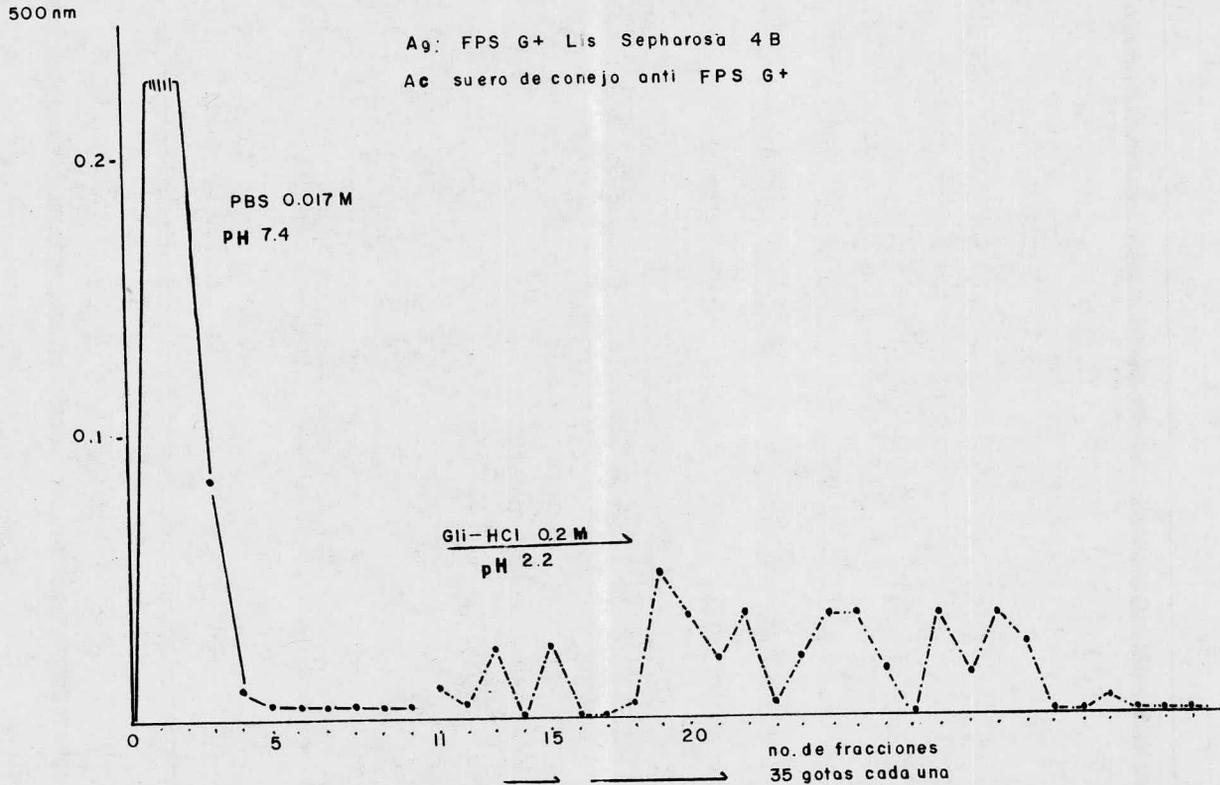
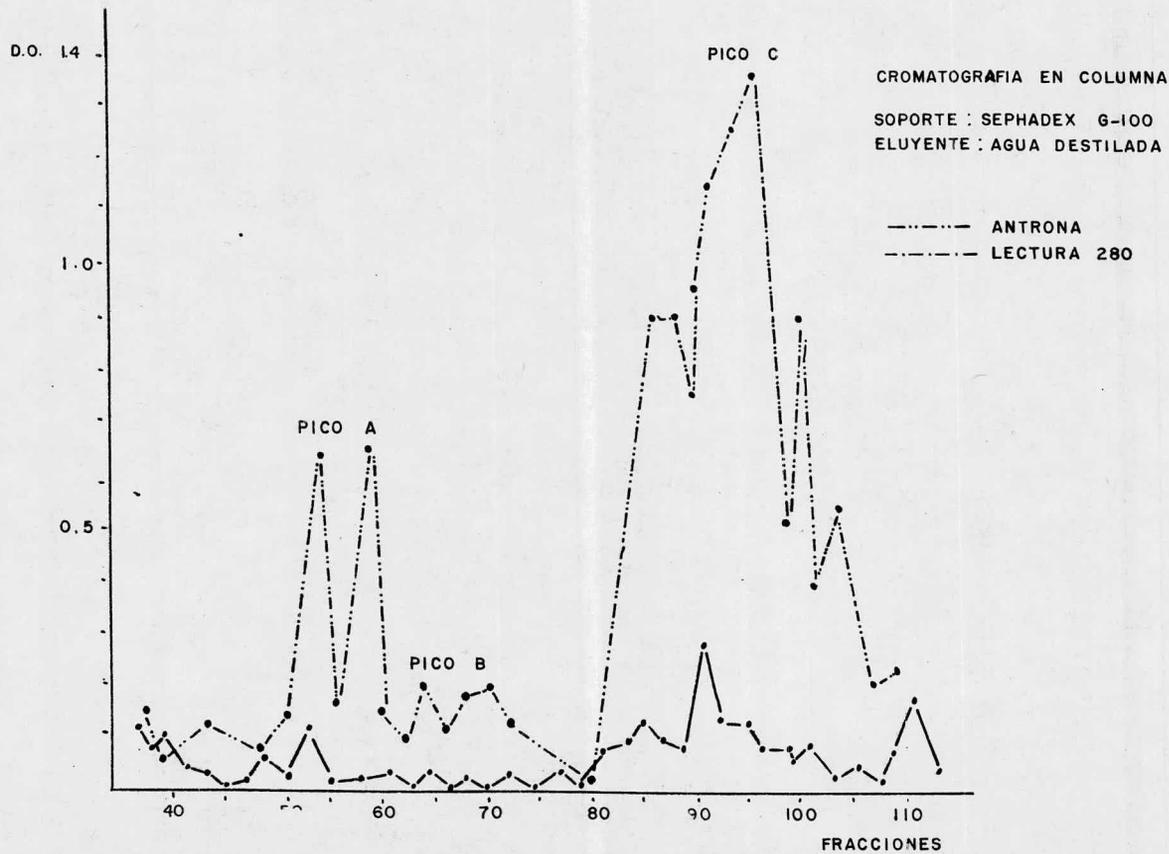


fig.7



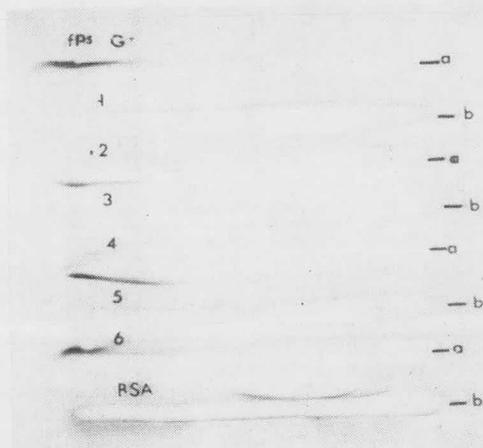


Fig 8.- Placa de inmunolectroforésis
 inciso 3.I. a) suero anti FPS
 G+ ; b) suero anti BSA; 1,2) -
 pico A ; 3,4) pico B ; 5,6) pico C

Este pico se unió a Sepharosa 4B activada con BrCN. A este inmunoadsorbente, se le pasó 1 ml de suero de conejo anti FPS G⁺. Como se puede observar en la figura 10, se pudieron separar dos picos definidos, el eluido a través de PBS pH 7.4 y el obtenido por GI-HCl pH 2.8.

Con estos datos es muy difícil sacar una conclusión definitiva: Los resultados de la IDR, IEF y CPC, demuestran que los productos obtenidos de los tres picos, reaccionaron únicamente contra el suero de conejo anti FPS G⁺, mientras que, contra anti-BSA fueron negativos en todos los casos.

El IAD nos permite pensar, o que al pasar el suero de conejo anti FPS G a través de la columna hubo, separación de dos tipos de moléculas: las encontradas en la elución con PBS (que fueron la mayoría) que aparentemente no reaccionaron con los determinantes antigénicos del polisacárido unido a la Sepharosa 4B activada a través de BSA; y las eluidas con GI-HCl, que a pesar de ser la minoría, si reaccionaron con ciertos determinantes del polisacárido, pero desafortunadamente, las cantidades obtenidas fueron tan escasas, que no fue posible hacer cualquier experiencia que nos permitieran demostrar en forma

concluyente lo que se buscaba.

Los picos B y C, a la IEF fueron positivos (figura 8), frente al suero anti polisacárido, pero negativos frente al suero anti BSA.

La CPC (fig. 9), de estos productos nos indican también que hemos trabajado en exceso de antígeno polisacárido.

II.- En este caso se empleó polisacárido derivado de Salmonella durham salvaje (G⁻), en las mismas condiciones que el anterior (pág. 22).

La cromatografía en columna de Sephadex G-100, (fig. 11) representa un solo pico revelado por el reactivo de Folin, este producto después de liofilizado se sometió a IDR (fig. 12).

La placa obtenida muestra sólo reactividad frente al suero anti FPS G⁻, con negatividad total hacia el suero anti BSA, lo que nos hace pensar que probablemente en estas condiciones los determinantes antigénicos de la BSA sufrieron alguna modificación.

III.- Por este procedimiento se siguieron tres modalidades--

fig.9

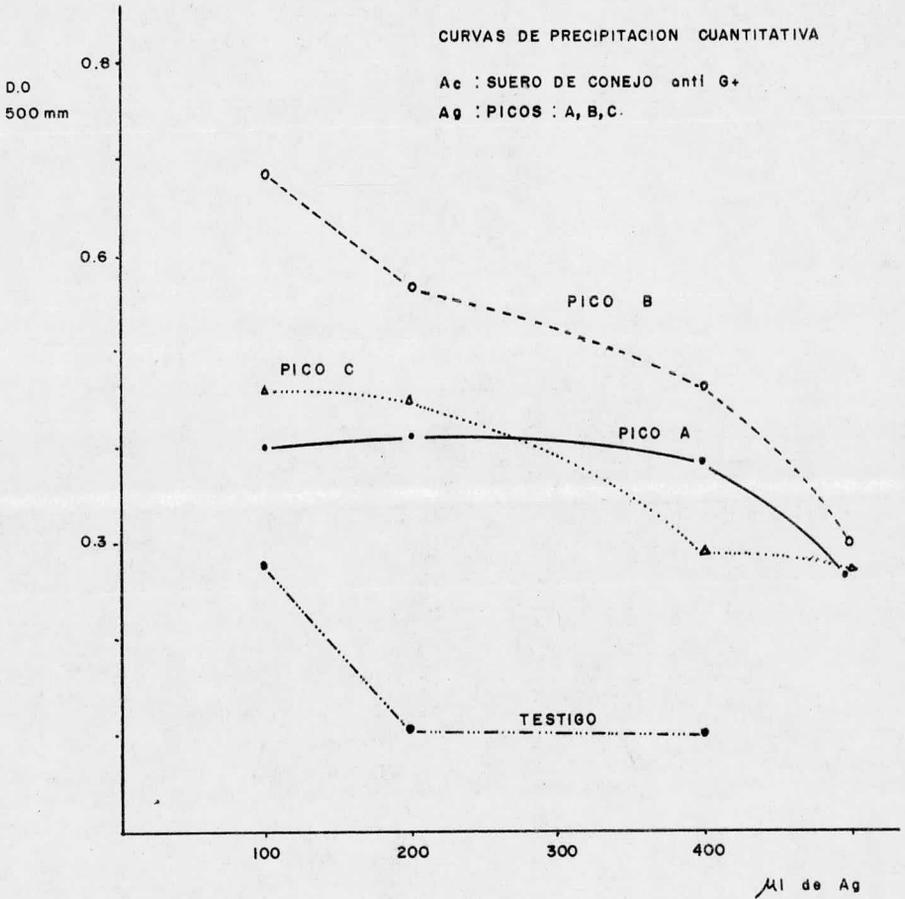


fig. 10

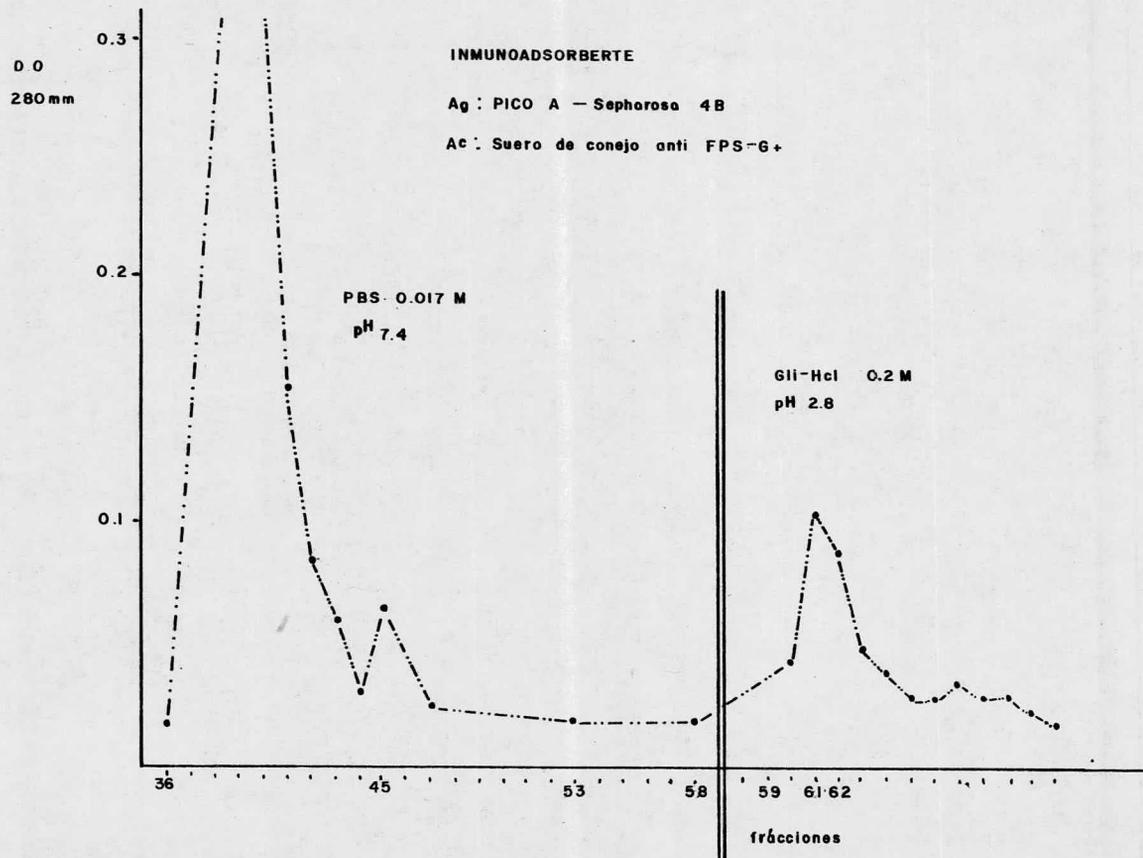


fig. 11

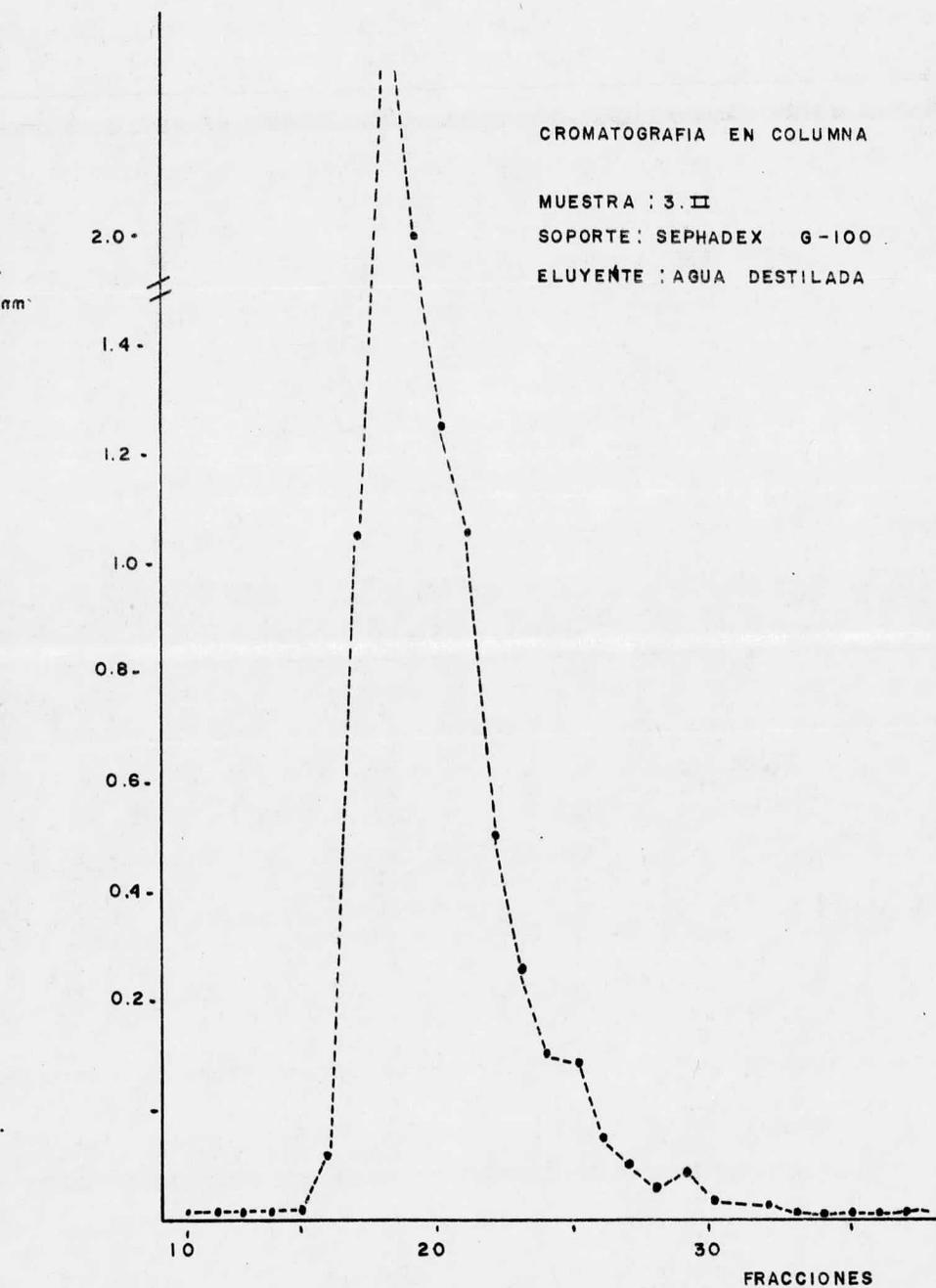




Fig 12.- Fleca de inmunodifusión radial

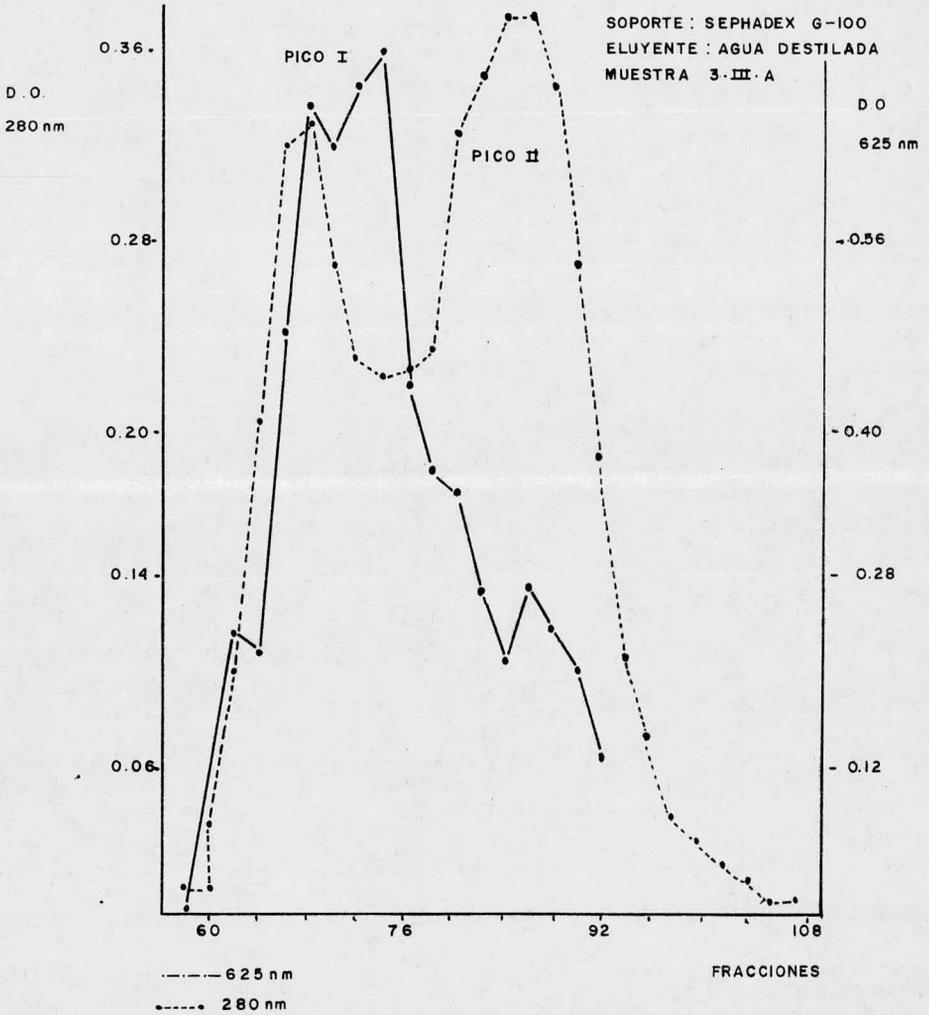
Fico A fracc 21-32. 1) fracc to tal; 2) dil 1/10 ; 3) dil 1/100
 4) dil 1/1000; 5) FPS G- anti - FPS G- ; 6) BSA anti BSA.

des (pág. 23), con los siguientes resultados:

- A). El producto obtenido, (rendimiento 30 mg), se liofilizó, y se sometió a IDR e IEF (figs. 14, 15 y 20). De los 30 mg del liofilizado, 16.5 mg se pasaron por columna de Sephadex G-100 (fig. 13). Las fracciones obtenidas, se leyeron a $E = 280$ nm y revelaron la presencia de dos picos; también fueron leídas a $E = 625$ nm por medio de la reacción de Antrona y revelaron un pico. Ambas fracciones fueron estudiadas en IDR e IEF (figs. 14, 15, 16, 17, 19 y 20).
- B). Antes de acoplar el FPS (10 mg) a BSA disuelta en PBS, éste se dializó contra PBS, una vez terminada la reacción, el producto resultante se dializó contra agua destilada, se liofilizó y una porción disuelta en solución salina isotónica, fue estudiada en IDR e IEF (figs. 20 y 21).
- C). Con esta última variante, el FPS activado (10 mg), fue sometido a diálisis contra NaHCO_3 pH 8.0, previa a la unión con BSA, posteriormente se redializó contra agua destilada, se liofilizó y observamos su comportamiento

fig. 13

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA



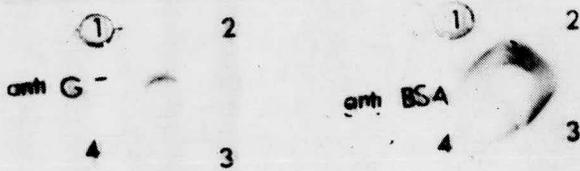
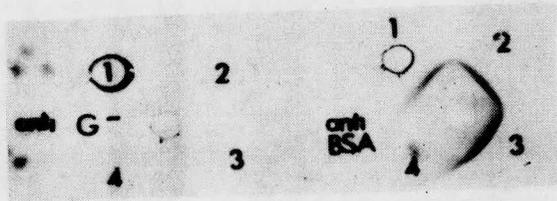


Fig 14.- Placa de inmunodifusión radial
 1) pico I; 2) pico II ; 3) lio-
 filizado III.A; 4) sol. salina.

Fig 15.- Placa de inmunodifusión radial.
 Las mismas fracciones diluidas
 1/10.



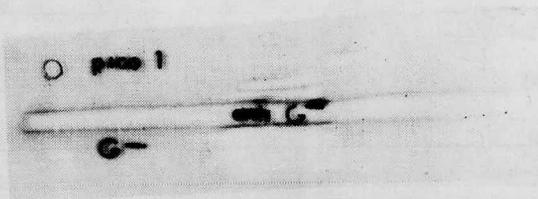


Fig 16



Fig 17

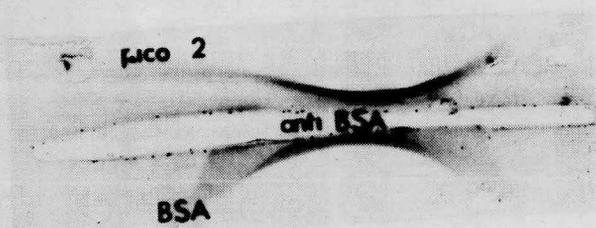


Fig 18

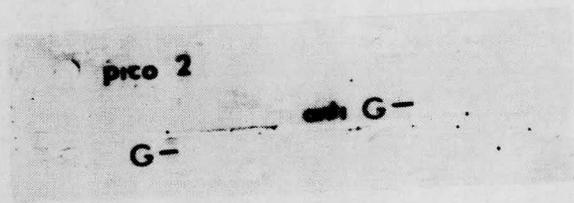


Fig 19

Placas de inmunoelectroforésis Picos I y II del inciso III.A.

en IDR e IEF (figs. 20 y 21).

Como se puede observar los resultados: prácticamente en todos los casos, las muestras reaccionaron sólo frente al suero de conejo anti BSA, exceptuando la muestra del inciso B que no reacciona ante ningún suero inmune y el caso del pico I del inciso III. A, que muestra una débil reacción frente al suero de conejo anti FPS G⁻ (fig. 15).

En la IEF, el pico I, en presencia de suero anti BSA, corre aparentemente más rápidamente que la muestra testigo de BSA (fig. 17).

El producto resultante del procedimiento C, en IEF, muestra una clara diferencia, entre él y la BSA nativa frente al suero anti BSA (fig. 20).

Con estos datos, podemos concluir, que con el procedimiento A (pico I) y C, los productos resultantes de la reacción, están compuestos aparentemente de BSA FPS G⁻, unidos covalentemente, ya que la cromatografía (fig. 13) separa dos picos y en la IDR (fig. 15) es positivo el pico I, ante el suero anti FPS G⁻, mientras que en la IEF (figs. 17 y 20), el comportamiento del suero anti BSA, frente a las fracciones antes dichas y la BSA nativa, es distinto.

IV.- Después de la activación del FPS G⁻, la muestra fue dividida en tres porciones (pág. 24), con las que se realizaron otras tantas variantes: A, B y C, siendo esta última, igual a la variante III-C, la que se empleó como testigo positivo, ya que aparentemente, mostró unión covalente entre el FPS G⁻ y la BSA (fig. 20).

A). En este procedimiento (30 mg de FPS G⁻), después de una serie de pasos y como resultado de la centrifugación se obtuvo un precipitado (PP) y un sobrenadante (SN), a ambos se les practicó la reacción a la Antrona y la de Folin.

	Antrona	Folin
<u>sn</u>	+++	++++
<u>pp</u>	++++	+

La IDR e IEF son negativas en ambos casos, para anti FPS G⁻, mientras que sólo el pp fue pp fue positivo frente a suero anti BSA en IDR; el sn resulta positivo para el mismo antisuero tanto en IDR como en IEF (figs. 22, 23 y 24).

B). En este caso, a una alicuota (30 mg) del polisacárido -

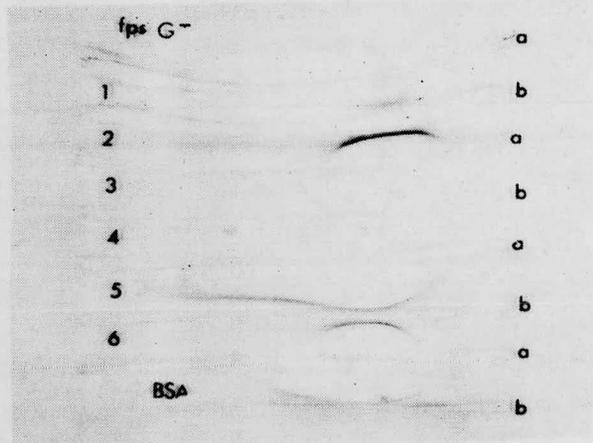
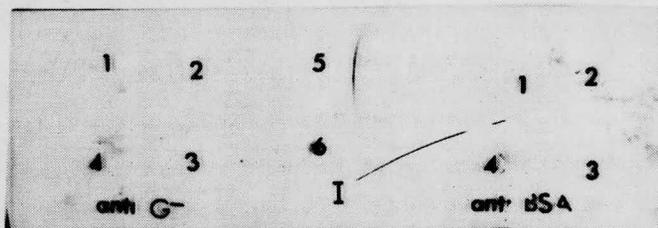


Fig 20.- Placa de inmunoelectroforésis
 1,2) muestra liofilizada del inciso III.A a 1000 y 100 g/ml respectivamente; 3,4) muestra del punto III.B y dil 1/10 de la misma; 5,6) muestra mencionada en el inciso III.C y dil 1/10 de la misma. a) suero anti FIS G- . b) suero anti BSA.

Fig 21.- Placa de inmunodifusión radial
 1,3) solución salina isotónica;
 2,4) muestra del inciso III.B y dil 1/10 de la misma; 5) BSA anti BSA.



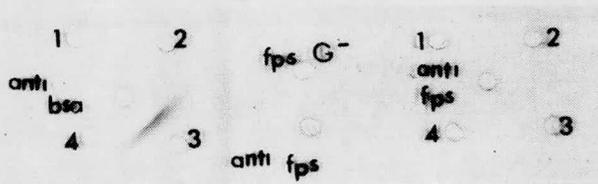


Fig 22.- Placa de inmunodifusión radial
 Fracción pp del inciso IV.A
 1,3) 1000 y 100 μ /ml res-
 pectivamente; 2,4) solución-
 salina isotónica.

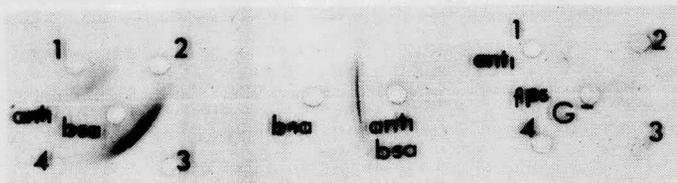


Fig 23.- Placa de inmunodifusión radial
 Fracción en del inciso IV.A
 1,3) 1000 y 100 μ /ml res-
 pectivamente ; 2,4) solución
 salina isotónica.

activado, se le agregó BSA disuelta en agua destilada, y se dializó contra PBS 0.017 moles/litro pH 7.4, se liofilizó y colocó en IDR e IEF, así como también una curva de precipitación cuantitativa.

La figura 25, muestra (en IDR) que el liofilizado sólo es positivo para anti BSA, cosa que sucede igualmente en la IEF, sin embargo, en esta última (fig. 26), - se pueden observar perfectamente dos arcos de precipitación, cuyas velocidades de corrimiento son diferentes, el más cercano al ánodo (+), corresponde a BSA, mientras que el de corrimiento más lento (cerca no al cátodo -), corresponde probablemente a BSA -- unido al FPS G⁻.

Las curvas de precipitación cuantitativa, con suero -- anti FPS y BSA, nos muestran que ambos sueros inmunes reaccionan con el producto (fig. 27).

Ante estos datos, podemos señalar que por el procedimiento B, aparentemente, hay cierta reactividad, entre FPS y BSA, siendo demostrado por la IEF (fig. 26), sin embargo, las CPC, si bien nos muestran la presencia de ambos antígenos, no

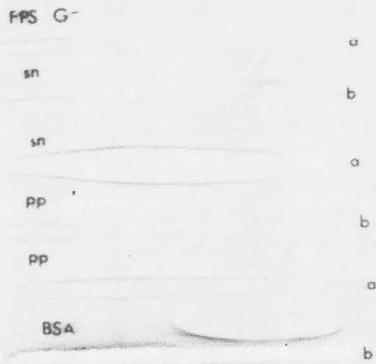


Fig. 24.- Immunoelectroforésis.
 Se repite la muestra en la placa
 ya que se encuentran a dos con--
 centraciones distintas a 1000 y-
 100 m/ml. a) suero de conejo an-
 ti FPS G⁻; b) suero de conejo an-
 ti BSA.

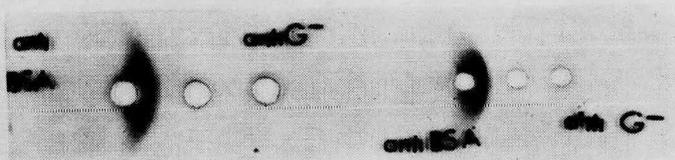
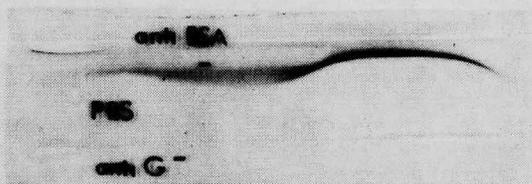


Fig 25.- Inmunodifusión radial de la muestra obtenida en el inciso IV.B. pozo central.

Fig 26.- Placa de inmunolectroforésis obtenida con la muestra del inciso IV.B



podemos descartar la posibilidad de que se trate de una mezcla de los dos productos reactivos (FPS y BSA), sin ninguna interacción química entre ellos, ya que no se hizo cromatografía de separación en columna.

C). Se obtuvieron los mismos resultados que con el procedimiento III-C.

4. Activación de FPS con m-peryodato de sodio y acoplamiento a BSA.

I.- La inmunoelectroforesis e inmunodifusión fueron negativas (no se fotografiaron las placas).

II.- Los resultados de la cinética efectuada en este inciso (pág. 26), observados a través de la IDR (figs. 28 y 29) e IEF (fig. 30), fueron totalmente negativos frente a los dos sueros estudiados, por lo que se interfiere que, por medio de esta reacción se destruyen los determinantes antigénicos del polisacárido G⁻ y sero-albúmina -- bovina.

5. Activación de FPS G⁻ y acoplamiento a BSA a través de diazotación.

La IEF, IDR y la CPC hechas entre los productos de --

fig. 27

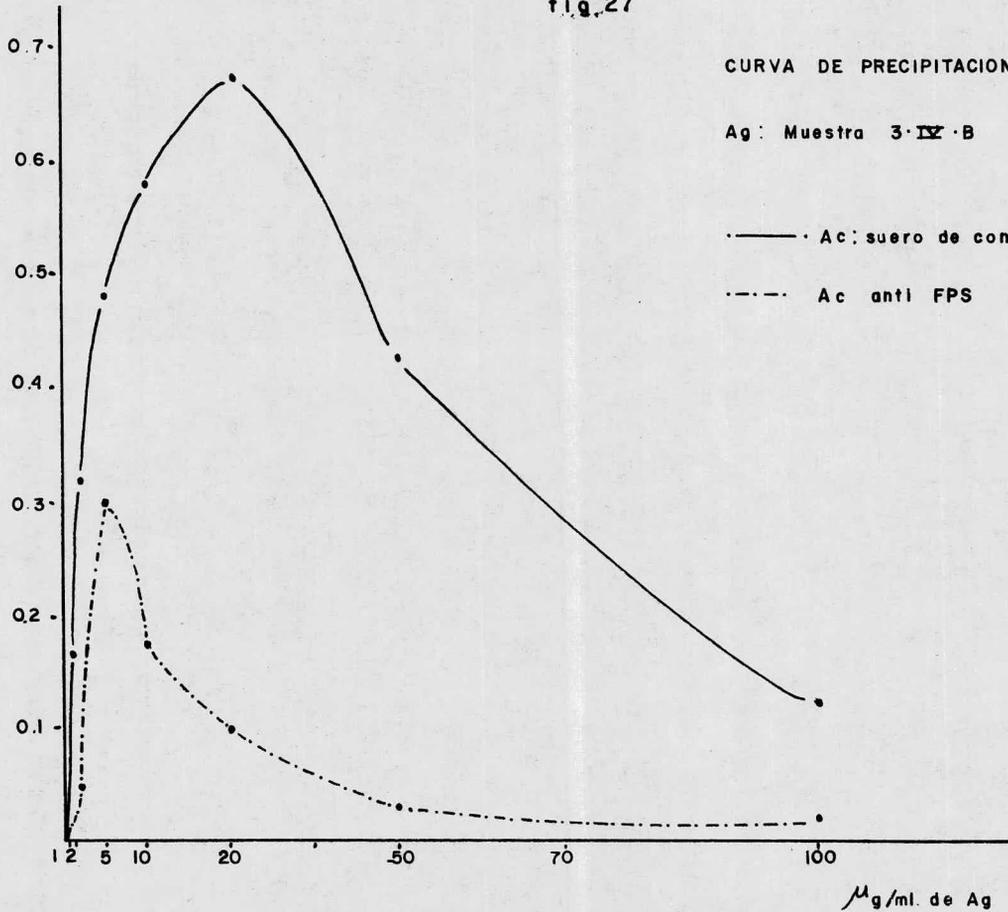
D.O.
500 nm.

CURVA DE PRECIPITACION CUANTITATIVA

Ag: Muestra 3-IX-B

— Ac: suero de conejo anti BSA

- - - Ac anti FPS G-



los tres ensayos (págs. 26 y 27), y los sueros anti FPS G⁻ y anti sero albúmina bovina fueron negativos.

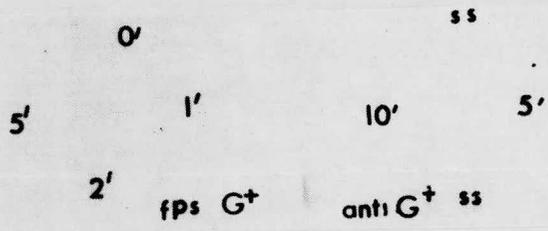


Fig 28.- Placa de inmunodifusión radial inciso 4.II con anti FPS G⁺

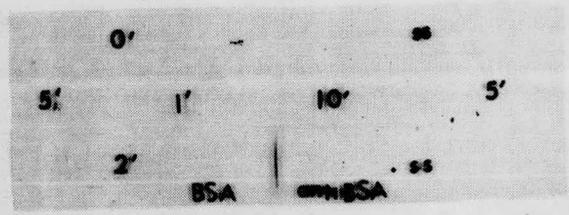


Fig 29.- Placa de inmunodifusión radial inciso 4.II con anti BSA

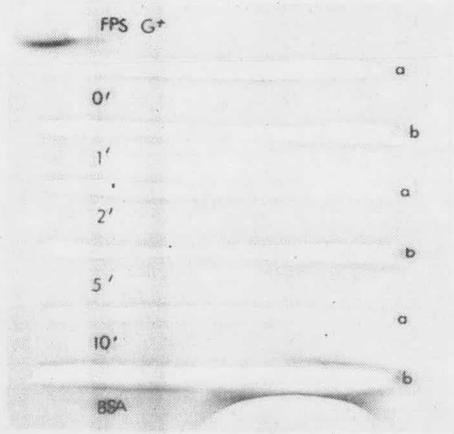


Fig. 30.- Inmunoelectroforésis de las muestras del inciso 4.I.. a) suero anti FPS G+; b) suero anti BSA.

DISCUSSION

El acoplamiento de polisacáridos a un aminoácido o a una proteína, resultaba aparentemente muy sencillo pues existen antecedentes de reacciones similares con otros polisacáridos. Ante estos hechos, los primeros intentos de acoplamiento de los FPS G⁺ y FPS G⁻ a lisina, por medio de la reacción con m-peryodato de sodio (20) y bromuro de cianógeno (21), respectivamente, se realizaron con la certeza de que era un procedimiento que no presentaba problema alguno, por lo que no se efectuó ninguna prueba para demostrar dicho acoplamiento, de esta manera se prosiguió con el siguiente paso, o sea, tratar de unir el compuesto (polisacárido lisina) a Sepharosa 4B activada con BrCN y formar así el primer inmunoadsorbente, que nos permitiera separar los anticuerpos específicos dirigidos contra el polisacárido, del suero de conejo anti FPS G⁺ o G⁻. Los anticuerpos retenidos en la columna, se separaron de ésta, por cambios de pH y molaridad, por medio de soluciones reguladoras, clásicas para este efecto (Gly-HCl 0.2 moles/litro pH 2.8).

Una vez separados estos anticuerpos, pensamos que no debe existir ningún problema para unirlos directamente a Sepharosa 4B (16), debido a que es una técnica usada en inmunología prácticamente como rutina, con este segundo inmunoad

sorbente se planeaba iniciar la separación de determinantes an tigénicos específicos de los polisacáridos y así evitar la rutina larga y tediosa que se tiene que seguir actualmente para poder determinar la estructura química y biológica de unidades de repetición de polisacáridos (en nuestro caso), derivados de Salmonella.

Nuestros primeros ensayos con el inmunoabsorbente vistos a través del perfil cromatográfico (figs. 3, 4 y 5), resultaron satisfactorios, pues obtuvimos una fracción aparentemente no específica, la cual salía en la elución de PBS; mientras que en la elución con Gli-HCl, se obtuvo la fracción con aparente especificidad.

Al neutralizar, concentrar y resuspender este producto en solución salina isotónica (supuestamente anticuerpos espe cíficos vs el polisacárido), observamos:

- a) El rendimiento, medido por concentración protéica era muy bajo;
- b) Al tratar de hacerlo reaccionar por medio de técnicas inmunológicas (IDR, IEF, CPC), en presencia de sus antígenos polisacáridicos, los resultados en todos los

casos fueron negativos; dicho de otra manera los su-
puestos anticuerpos específicos retenidos en la colum-
na, no reaccionaron con antígenos homólogos.

Ante este primer fracaso, pensamos que lo más útil --
sería revisar cada uno de los pasos realizados en las reaccio-
nes precedentes y, en particular, demostrar en primer lugar, -
por medios químicos e inmunológicos, si en realidad hubo un -
primer acoplamiento entre el polisacárido y el aminoácido o la
proteína que nos serviría de puente para unirlos a la Sepharosa
4B.

Para estos experimentos, se empleó sero-albúmina bo-
vina, en sustitución de la lisina y fueron introducidas una serie
de variaciones a los métodos ya empleados, además se intentó -
un nuevo método: la diazoación.

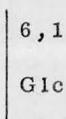
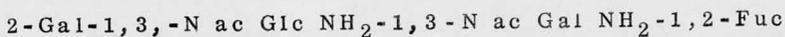
La activación de FPS G^+ con BrCN y su acoplamiento
a BSA dieron resultados que se prestan a discusión, así como a
interpretaciones, que se pueden obtener por inferencia al rela-
cionar la estructura química del polisacárido y su comportamien-
to ante las pruebas que fueron realizadas.

En su primer intento de dar una hipótesis consistente,

vamos a hacer un repaso somero acerca de la estructura química y comportamiento inmunológico del FPS G .

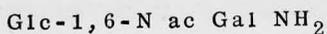
La probable estructura química así como su comportamiento inmunológico, se basan en los resultados obtenidos por A. Isibasi, presentados como tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Inmunología).

La unidad química de repetición del FPS G , es probablemente:

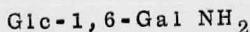


Serológicamente pertenece al grupo G de la clasificación de Kauffman y White, tiene los determinantes antigénicos 'O' 1, 13, 23, 36 y 37. Los factores 1, 37, aparecen después de la lisogenización de la bacteria Salmonella durham salvaje (no convertida, factores 'O' 13, 23, 36) por el fago 1, 37.

Este polisacárido es conocido con certeza en su determinante 'O' 1, el que está constituido por:



que corresponde al mismo factor 1 de FPS R (Salmonella -
johanesburg (6) pero que difiere al factor 'O' 1 de otras salmo-
nelas: seftenberg (24), paratyphi (25), typhi (26) y zürich (27) -
que es:



La activación del FPS G con BrON y el acoplamiento posterior a BSA, hacen suponer por los resultados obtenidos, -- que el fenómeno se realiza (fig. 10).

Cabe hacer resaltar que por medio de esta reacción la BSA sufre cambios tan importantes en su estructura química, -- que de cierta manera la desnaturaliza, a tal grado que en pre-- sencia del suero anti BSA nativa (figs. 8 y 9).

Esta desnaturalización no es ningún inconveniente, ya - que sólo nos interesa la BSA como ligando intermediario entre - Sepharosa 4B y polisacárido, del cual si es importante mantener intactos los determinantes antigénicos.

Todo estaría perfecto a no ser por el hecho de que si - bien el antisuero anti FPS G⁺, continúa reaccionando en IDR -- contra este mismo antígeno modificado por el tratamiento de -

BrCN; en la IEF (fig. 8) permanece su arco de precipitación, - en el mismo sitio, que el polisacárido no modificado y no se -- revela algún otro arco ante el suero de conejo anti FPS.

Si desde el punto de vista inmanológico, a través de -- la prueba de IEF no podemos asegurar que hubo un verdadero - acoplamiento, entre BSA y polisacárido, desde el punto de vis- ta químico, podríamos hacer especulaciones en el sentido de -- que, al pasar el polisacárido tratado BSA en columna de Sephade x G-100, obtenemos 3 picos (fig. 7) lo que nos haría suponer - que se han separado tres especies moleculares diferentes, en las que, probablemente, la primera podría corresponder a estas dos macromoléculas unidas, las cuales saldrían en el volumen de ex clusión, por efecto de su peso molecular más elevado en compa- ración con el de cada molécula por separado; aparentemente es- to es real, pues el primer pico de las lecturas del polisacárido a través de la antrona, corresponden a un cierto aumento, en las lecturas para proteínas.

Posteriormente, las lecturas para proteína, descien-- den prácticamente a cero y vuelven a ascender en el mismo si- tio del tercer pico revelado por la antrona, sin embargo, cabe

señalar perfectamente, que las lecturas para proteíñas se encuentran dentro de un rango muy bajo, del orden de 0.050 a 0.060 de absorbanza y que además, la presencia de los tres picos revelados a la antrona (polisacáridos), no es nada nuevo, ya que se sabe perfectamente que el FPS G⁺, es una molécula muy heterogénea en cuanto a peso molecular (fig. 31).

El único argumento más o menos válido que nos queda, es el de que al preparar el inmunoadsorbente (pico I del FPS G BSA) obtenemos a la elución (fig. 10) con Gli-HCl un grupo de proteíñas derivadas del suero de conejo anti FPS G, que se han unido específicamente y que pueden ser anticuerpos. La cantidad obtenida de estos supuestos anticuerpos, es tan pequeña en relación a lo que no se une (eluido de PBS), que una vez que se han dializado con entrada y resuspendido en solución salina isotónica, no reacciona contra 10 que se supone su Ag homólogo.

En fin, podemos señalar que hay ciertas evidencias de este acoplamiento, que la reacción no destruye los determinantes antigénicos del polisacárido pero que por alguna razón desconocida, si bien hay un atrapamiento de moléculas específicas por medio del inmunoadsorbente, éstas en el proceso de purificación, sufren alguna alteración, que las hace perder su reactivi-

vidad antigénica.

Los siguientes tres experimentos de activación de polisacáridos con BrCN, se realizaron con FPS G^m, cuya probable estructura química es la siguiente:



Sus determinantes antigénicos 'O' de acuerdo a la clasificación de Kauffman y White son 13,23,36; no se conoce la estructura de ninguno de ellos, esto es, se sabe su probable unidad química de repetición pero no su unidad química biológica.

De las variedades técnicas restantes, se hicieron (II, III y IV) incluyen todas las modificaciones de cada una de ellas (A, B, C), en apariencia, hubo resultados relativamente satisfactorios en las variantes III. A (pico I) y C. Así como IV. B.

Sin embargo distan de ser concluyentes. En el primer caso (fig. 13), desde el punto de vista químico, es posible separar dos grupos moleculares y en uno de ellos, el primero -- llamado pico I, coinciden las lecturas tanto a la antrona para azúcares, como al reactivo de Folin para proteínas, sin embargo, en este procedimiento al igual que en el IV. B, la inmuno--

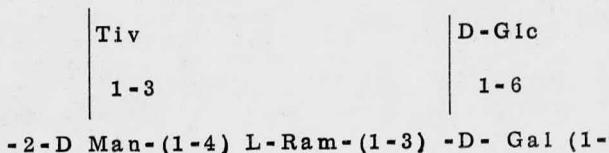
electroforesis nos demuestra que si hay una migración distinta la seroalbúmina bovina y el polisacárido de Freeman, probablemente unidas y la seroalbúmina bovina nativa ante el suero anti seroalbúmina bovina (fig. 20 y 26), pero al contrario de lo ocurrido con el polisacárido de Freeman cepa convertida por el fago 1-37, en este caso, nunca hubo reactividad ni a la inmunodifusión radial, ni a la inmunoelectroforesis con el suero de conejo anti polisacárido de Freeman cepa salvaje, frente a su antígeno homólogo.

Estamos ante el hecho de que el acoplamiento puede ser factible en forma más segura con el polisacárido de Freeman cepa salvaje, pero también nos encontramos que lo que nos interesa (el polisacárido), durante la manipulación para obtener su reactividad pierde su antigenicidad frente a su suero homólogo.

Las técnicas de activación del polisacárido de Freeman, con m-peryodato y diazotización, para unirlo a la seroalbúmina bovina, aparentemente en nuestro trabajo experimental, no muestra resultado positivo alguno.

CONCLUSIONES

El acoplamiento de estos dos polisacáridos a una proteina, no es tan sencillo como lo relatan las técnicas clásicas para este procedimiento; personalmente me inclino a pensar -- que en nuestro caso, los polisacáridos que se tomaron como modelo para realizar este tipo de reacciones, tienen algunas características propias, que no les permiten llevar a cabo una -- reacción de acoplamiento tan fácilmente. Hasta la actualidad, -- los estudios de acoplamiento de polisacáridos con proteínas se habían llevado a cabo con polisacáridos provenientes principalmente de neumococo (28) que en general tienen una unidad de repetición química más sencilla (2 a 3 azúcares) y que uno de -- ellos tiene generalmente un radical ácido muy reactivo; sin embargo, en el laboratorio donde fue realizado este trabajo, el -- polisacárido de Freeman derivado de Salmonella typhi (29), a -- pesar de tener una unidad química relativamente complicada.



por el simple método de activación con BrCN, fue posible acoplarse, tirosina a través de un derivado de la misma (tiramina).

En nuestro caso no se efectuó esta técnica, pues el gru

po reactivo de la tiramina que se une al polisacárido (29) es - uno solo, por lo que queda bloqueado y sin otro grupo reactivo con el cual reaccione la Sepharosa 4B y establecer de este modo el puente ésta última y el polisacárido.

Probablemente la configuración de los dos polisacáridos, tenga mucha importancia en su reactividad inmunológica, - pues mientras que en el polisacárido cepa convertida por el fago 1-37, hay una glucosa lateral, la que le confiere cierta estabilidad cuando se activa y acopla a la seroalbúmina bovina y - permite que continúe reaccionando con su suero homólogo, el - polisacárido cepa salvaje, al faltarle esa glucosa lateral, las - condiciones tan alcalinas (pH 11,12) en las que se trabaja, hagan que la fucosa (6-desoxi-D-Gal) que es tan sensible a pH muy elevado, sea en alguna forma modificada o destruída, por lo que la configuración de la unidad de repetición del polisacárido, pierda toda reactividad inmunológica.

Creemos que este tema debe ser estudiado con más profundidad, ya sea haciendo más experimentos, o tratando de repetir los mismos, pero con otros polisacáridos derivados de - - otras Salmonellas.

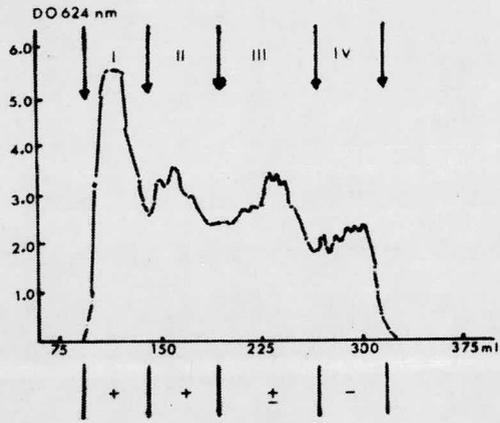


Fig. 31.- Cromatografía en columna de Sephadex G-100. del Polisacárido FPS G-. Eluyente: agua destilada.

B I B L I O G R A F I A

1. Kauffman, F. (1966): The bacteriology of Enterobacteriaceae, E. Munksgaard, ed. Copenhagen.
2. Nghiem, H.O. (1966): Détermination de la structure du polyosyde spécifique d'une Salmonella du groupe D. Memoires présentée a La Faculte des Sciences de l'Université de Paris, pour obtenir le -- Diplome d'Etudes Superieures de Sciences.
3. Staub, A.M.; Raynaud, M. (1970): Course d'Immunologie -- Générale et de Sérologie. D'I Institut Pasteur. Fascicule III, 5, Place de la Sorbone, Paris-V.
4. Freeman, G.G. (1942): The preparation and properties of a - specific polysaccharide from Bacterium -- typhosum T y 2. Biochem. J. 36:340.
5. Nghiem, H.O.; Girard, R. and Isibasi, A. (1973) Méthodologie de la Structure et du Métabolisme des Glycoconjugés. Tome II, 751-758.
6. Girard, R. (1973) Etudes chimique et immunochimique de - deux polyosides bactériens extrait de Salmonella johannesburg souche 5.5 sauvage et de Salmonella johannesburg souche 5.58 convertie par le phage 1 (0). These de Doctorat D'Etat es Sciences naturelles présentée a la Faculte des Sciences. Université de Paris-VII.
7. Campbell, D.H. (1970) in Methods in Immunology. 2nd edited by W.A. Benjamin Inc. New York, USA, 159, 263.
8. Bagdian, G. and Makela, P.H. (1971) Antigenic conversion by phage P27. I. Mapping of the prophage attachment site on the Salmonella chromosoma. Virology: 25:86.
9. Ouchterlony, O. (1953) Antigen-antibody reactions in gels IV. Types of reactions in coordinated systems of - diffusion. Acta. Pathol. Microb. Scand. 32: 2311.

10. Johansson, B.G. (1972) Agarosa gel electroforesis. Scand. J. Clin. Invest. 29 Suppl.124
11. Sepúlveda, B.; Lee, E.; De la Torre, M. and Landal. El diagnóstico serológico de la amibiasis invasora con la técnica de inmunolectroforesis cruzada. Arch. Invest. Med. (Mex) 2 (supl 1):263
12. Heidelberger, M.; Kendall, E.F. (1932) Quantitative studies on the precipitin reaction. The determination of small amounts of a specific polysaccharide. J. Exp. Med. 55: 555.
13. Heidelberg, M.; Kendall, E.F. (1935) The precipitin reaction between type III Pneumococcus polysaccharide and homologous antibody. J. Exp. Med. 61:563.
14. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R. (1951) Protein measurement with Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265.
15. Cuatrecasas, M.; Wilchek, (1968) Anfinsen. Proc. Nat. Acad. Sci. 61:636.
16. Axen, R.; Prath, J.; and Ernback, S. (1967) Nature. 214: 1302.
17. Montreuil, J.; Spik, G. (1968) Microdosage des Glucides (Monographie No. 2). Monographies du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille.
18. Avrameas, S.; Ternynck, T. (1972) Polyacrylamide-Protein immunoabsorbents prepared with glutaraldehyde. Febs Letters 23:4.
19. Work, T.S.; Work, E. (1969) in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology; edited by North-Holland Publishing Co. Amsterdam-London. Vol I. 35

20. Lowe, C.R.; Dean, P. D. G. (1974) in Affinity Chromatography, edited by John Wiley & Sons. London, New York, Sidney, Toronto, 213.
21. Lowe, C.R.; Dean, P.D.G.; (1974) in Affinity Chromatography, edited by John Wiley & Sons. London, New York, Sidney, Toronto, 206.
22. Goebel, W.F.; and Avery, O.T. (1931) The synthesis of the p-aminobenzyl ether of the soluble specific substance of type II Pneumococcus and its coupling with protein. J. Exp. Med. 54:431.
23. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Revers, P.A. and Smith, F. (1956). Anal. Chem: 28:350.
24. Staub, A.M.; Girard, R. (1965) Etude immunochimique sur les Salmonella. Analyse des facteurs "1" des groupes B, E₄ et C leur rapport avec les facteurs 1, 19 et 37. Bull. Soc. Chim. Biol. 47:1245.
25. Luderitz, O.; Westphal, O.; Staub, A.M. and Nikaido, H. (1971) Isolation and chemical and immunological characterization of bacterial lipopolysaccharide in microbial toxins. edited by Wenbaum G, and S. J. A.Jl. 145.
26. Staub, A.M.; Tinell, R.; (1960) Bull. Soc. Chim. Biol. 42: 1537.
27. Nghiem, H.O. (1975) Polysides "O" et determinants antigeniques 1,27 et 46 de Salmonella zuerich: Leur rapport avec ceux presents chez d'autres Salmonella des groupes D et E. Problems poses par leur coexistence chez S. zuerich (1, 9, 12. (46), 27).
28. Jones, J.M.; Amsbaugh, P.F. and Prescott, B. (1976) Use of ¹²⁵I-labeled SSS-III to study serum antibody levels as well as the distribution and excretion of antigen after immunization. J. Immunol. 116: 41.

ABREVIATURAS.

FPS	Polisacárido de Freeman.
G ⁺	cepa convertida por el fago 1-37
G ⁻	cepa salvaje
BSA	seroalbúmina bovina
IDR	Inmunodifusión radial
IEF	Inmunoelectroforesis
CPC	Curva de precipitación cuantitativa
IAD	Inmunoadsorbente
Gal	Galactosa
Glc	Glucosa
GlcNH ₂	Glucosamina
GalNH ₂	Galactosamina
Fuc	Fucosa
N ac	Radical N-acetilo