

2 Ej 106 100 4/1/84



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

MECANISMO DE DESINTOXICACION DEL
POLISACARIDO DE Salmonella typhi EN
EL PLASMA DE RATAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MA. DOLORES RUIZ PUENTE



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

CONTENIDO

	PAG.
I. INTRODUCCION.	1
II. ANTECEDENTES.	3
1. Endotoxinas	4
2. Estructura de la pared celular de bacterias Gram negativas.	4
3. Estructura del lipopolisacárido.	6
4. Métodos de extracción de lipopolisacáridos.	11
5. Mecanismos de desintoxicación de endotoxinas.	12
6. Generalidades de lipoproteínas.	13
7. Inmunolectroforesis.	15
III. METODOLOGIA	18
1. Cultivo de la bacteria.	18
1.1. Cepa utilizada.	18
1.2. Preparación del inóculo	19
1.3. Cosecha.	20
2. Extracción del lipopolisacárido.	21
3. Extracción del polisacárido.	22
4. Preparación y purificación del lípido A.	29
4.1. Electrodialisis del lipopolisacárido.. . . .	30

5. Muestras de trabajo.	31
5.1. Plasma de ratas tratadas con lipopolisacárido.	31
5.2. Plasma de ratas tratadas con polisacárido de Freeman.	32
5.3. Plasma de ratas tratadas con lípido A.	32
6. Obtención de suero anti-rata obtenido en conejo.	33
7. Inmunoelectroforesis cruzada.	34
7.1. Lavado y secado de las placas.	36
7.2. Teñido de las placas.	36
 IV. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.	 39
1. Demostración de la interacción del lipopolisacárido de <u>S. typhi</u> con proteínas plasmáticas.	40
2. Demostración de la interacción del polisacárido de <u>S. typhi</u> con proteínas plasmáticas.	42
3. Demostración de la interacción del lípido A con proteínas plasmáticas.	44
 V. DISCUSION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.	 46
 VI. BIBLIOGRAFIA.	 49

A B R E V I A T U R A S

Tiv	Tivelosa
Man	Manosa
Ram	Ramnosa
Glc	Glucosa
Par	Paratosa
AraN	Aminoarabinosa
GlcN	Glucosamina
EtN	Etanolamina
Abe	Abecuesa
ACF	Adyuvante completo de Freund
AIF	Adyuvante incompleto de Freund

I. INTRODUCCION

La fiebre tifoidea es una enfermedad infecto-contagiosa producida por Salmonella typhi, la cual presenta en México características endémico-epidémicas ya que está directamente relacionada con deficiencias en el saneamiento ambiental y el aprovisionamiento de agua potable. Es una bacteria resistente a las bajas temperaturas y permanece viable durante varias semanas en el agua de pozos y depósitos.

Los avances en el estudio tanto químico como biológico de las endotoxinas, nos ha llevado a conocer profundamente la patogenia de la enfermedad, incluyendo los mecanismos de desintoxicación que fueron propuestos por Skarnes en 1958, al través de la interacción de la endotoxina con algunas proteínas plasmáticas (1).

Se ha propuesto que los mecanismos del huésped que actúan primero en la desintoxicación están relacionados con algunos componentes del plasma circulante y que éstos son responsables en gran medida de la supervivencia del huésped al choque endotóxico (2). Se ha mencionado que la inactivación de la acción letal ocurre como un segundo paso de reacción, siendo el primero la degradación de la misma.

En este trabajo se decidió investigar los mecanismos-

plasmáticos de desintoxicación de endotoxinas en ratas, tanto de la fracción antigénica o cadena de polisacáridos, como de la fracción tóxica o lípido A, tomando como testigo la molécula lipolisacáridica, como lo mencionan los antecedentes previos (3, 38, 41).

El análisis del plasma de las ratas tratadas con la endotoxina y las fracciones de ésta, se llevó a cabo por medio de la técnica de inmunolectroforesis cruzada (4) la cual, gracias a su sensibilidad, permitió un análisis más detallado de los resultados obtenidos.

II. ANTECEDENTES

El género Salmonella comprende una gran variedad de especies patógenas para el hombre o animales y habitualmente para ambos. En el hombre se dan tres formas de salmonelosis clínicamente diferentes: fiebres entéricas, septicémicas y gastroenteritis agudas.

El prototipo de la fiebre entérica es la producida -- por S. typhi. La fiebre tifoidea, contraída por la ingestión de alimentos o aguas contaminadas empieza, en general, de modo insidioso, tras un período de incubación de 7 a 14 días, -- con malestar, anorexia y cefalea, seguido de fiebre (5).

Los microorganismos ingeridos se multiplican en las -- vías digestivas, y algunos de ellos penetran en los linfáticos intestinales y viajan al través del conducto torácico hacia la corriente sanguínea, donde se diseminan por todo el -- cuerpo y se eliminan por la orina.

Se ha demostrado que durante la enfermedad activa, la tolerancia es debida a la presencia de grandes cantidades de endotoxina en la sangre y los tejidos. En estudios realizados en ratas que no muestran esta tolerancia durante la fase febril de la enfermedad, se ha sugerido que muchos de los síntomas se deben a las endotoxinas circulantes (2).

1. Endotoxinas.

El inicio de las investigaciones sobre las endotoxinas se estableció en la relación entre putrefacción y enfermedad durante la era pre.bacteriológica; y muchas de las descripciones iniciales de los efectos de tejidos putrefactos inyectados en animales son compatibles con la reactividad del huésped a la endotoxina.

El concepto de endotoxina como un veneno el cual es -capa a la desintegración de la célula, lo propuso Pfeiffer en el año 1892.

En otros estudios, Centanni dedujo que las bacterias Gram negativas producen un complejo de peso molecular elevado como parte de su membrana externa, o pared celular, llamado "complejo endotóxico", el cual, como un todo puede inducir toxicidad y muchas otras acciones biológicas (6) dependiendo de la dosis, la ruta de aplicación y la sensibilidad relativa de las especies de investigación.

2. Estructura de la pared celular de bacterias Gram negativas.

Lüderitz esquematizó la estructura de la pared celular de las bacterias Gram negativas, como se muestra en la figura No. 1 (7). El lipopolisacárido de las enterobacterias -

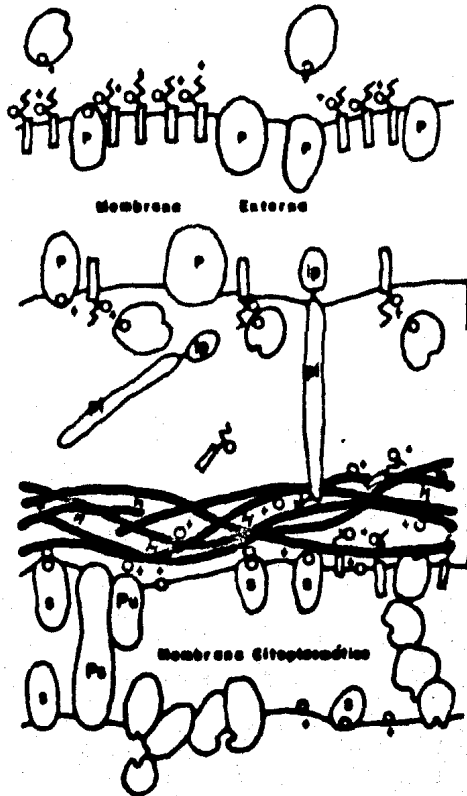


FIG. 1.- REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA PARED CELULAR DE LAS BACTERIAS GRAMNEGATIVAS.

S.- PROTEINA ESTRUCTURAL DE MEMBRANA CITOPLASMICA
p.- PROTEINAS ESTRUCTURALES Y ENZIMATICAS DE LA MEMBRANA EXTERNA
lp.- PORCION LIPIDA DE LA LIPOPROTEINA DE BRON
pl.- PORCION PROTEICA DE LA LIPOPROTEINA DE BRON
pl.- PROTEINA DE UNION
ps.- PERMEASA

se encuentra localizado en la pared celular y ésta se encuentra constituida por tres capas distintas (8,9).

a). Membrana citoplásmica. Es una doble capa de fosfolípidos orientados con regiones polares, asociándose a ellos proteínas por medio de interacciones fisicoquímicas con pequeñas cantidades de carbohidratos unidos a lípidos y proteínas.

Las proteínas están situadas en la superficie, en la parte media o en el interior y están constituidas esencialmente por proteínas estructurales y de transporte. En la membrana se realiza la biosíntesis de los diferentes constituyentes de la pared celular incluyendo el polisacárido (10).

b). Espacio periplásmico. Contiene peptidoglicano, responsable de la rigidez de la pared celular (11), que se encuentra unido a la capa externa al través de la lipoproteína-Braun (12).

c). La capa externa. Tiene un espesor de 75 a 85 nm está constituida de fosfolípidos, proteína específica y cantidades variables de lipopolisacárido que le dan la especificidad a la bacteria Gram negativa y que recibe el nombre de endotoxina.

3. Estructura del lipopolisacárido.

Entre los diversos géneros de microorganismos Gram --

negativos, las enterobacterias y especialmente Salmonella, se han investigado extensamente para la clasificación de su grupo. Del análisis estructural e investigaciones biosintéticas, se sabe que el lipopolisacárido de Salmonella está constituido por cadenas largas de monosacáridos conteniendo heteropolímeros compuestos de tres regiones diferentes como se muestra en la figura No. 2 (9).

La región I consiste de unidades repetidas de oligosacáridos, los cuales contienen azúcares con enlaces específicos, esto diferencia los lipopolisacáridos de diferentes serotipos (13, 14, 15). Las cadenas de oligosacáridos llevan la especificidad inmunológica de los respectivos antígenos O. Las unidades de repetición para Salmonella typhi se muestran en la figura No. 3; esta región se encuentra ligada a la región II núcleo basal, éste es un heteropolisacárido ácido; y es muy similar o común a los lipopolisacáridos de Salmonella, pero difiere en otros géneros de bacterias (16). La región II se encuentra ligada a su vez covalentemente a la región III que representa el componente lipídico del lipopolisacárido, por lo cual recibe el nombre de lípido A, y es un lípido glucosamino-disacárido acilado (17, 18). La estructura química de esta región que se conoce hasta ahora se ilustra en la figura No. 4 (14).

En la tabla No. 1 se muestran los azúcares que constituyen los antígenos de algunas Salmonellas de los grupos A,-

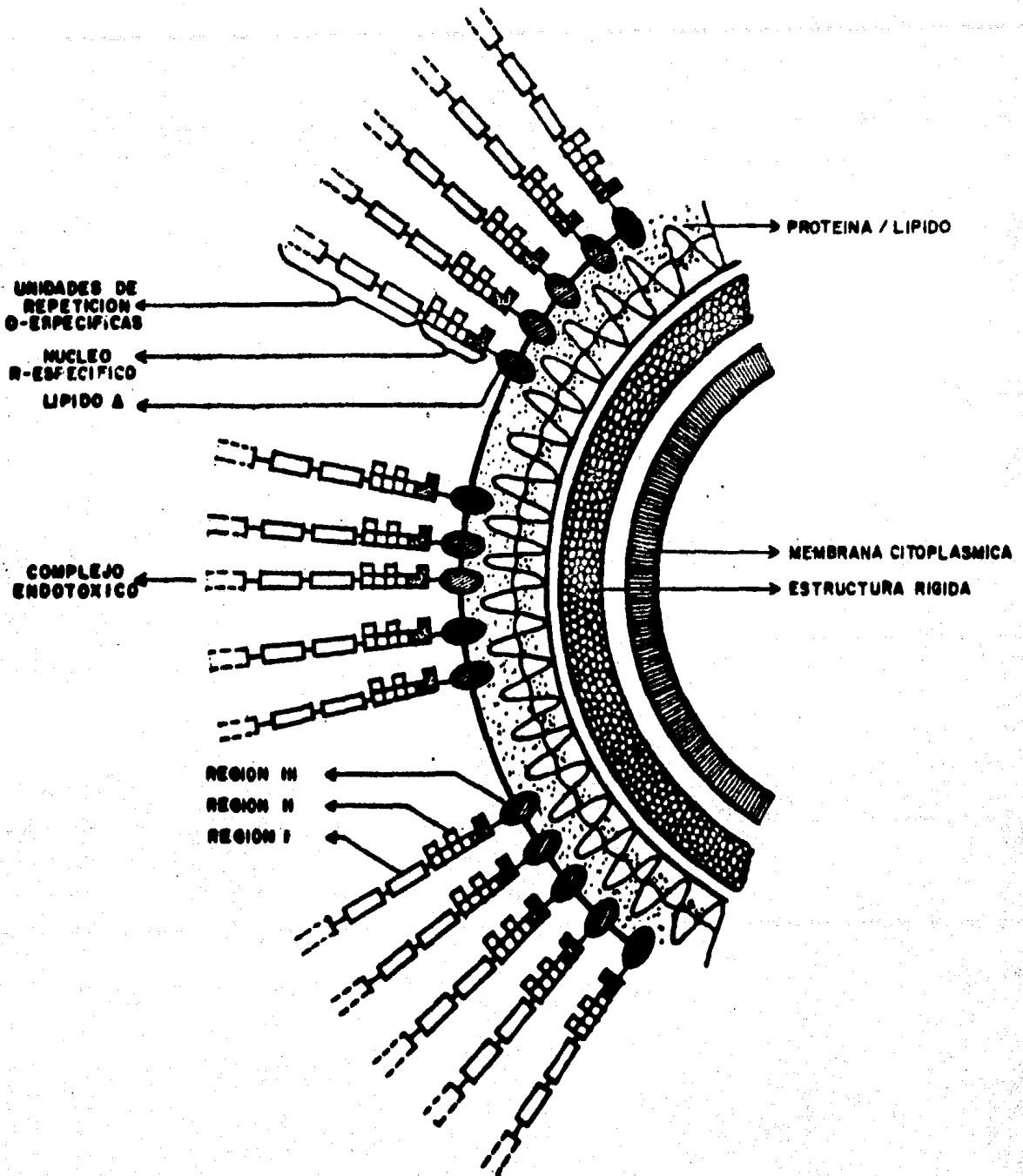


FIG. 2.- DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LA PARED DE *Salmonella* y *Enterobacteriaceae*.

(TOMADO DE G. Westphal: Bacterial endotoxins, Int. Archs. Allergy y appl. Immun. 49: 1-43, 1975).

TABLA No. 1
CLASIFICACION SEROLOGICA Y COMPOSICION DE
AZUCARES DE ALGUNOS ANTIGENOS DE Salmonella
(Kauffman y White) (14)

Serotipo	Grupo	Factores O	Azúcares
<u>S. paratyphi A</u>	A	1, 2, 12	Man Rha Par
<u>S. paratyphi A</u> var. <u>durazo</u>		2, 12	Man Rha Par
<u>S. abortus equi</u>	B	4, 12	Man Rha Abe
<u>S. paratyphi B</u>		1, 4, 5, 12	Man Rha Abe
<u>S. typhimurium</u>		1, 4, 5, 12	Man Rha Abe
<u>S. typhinurium</u> (mutante)		1, 4, 12	Man Rha Abe
<u>S. Bredenev</u>		1, 4, 12, 27	Man Rha Abe
<u>S. paratyphi C</u>	C ₁	6, 7	Man
<u>S. choleraesuis</u>		6, 7	Man
<u>S. newport</u>	C ₂	6, 8	Man Rha Abe
<u>S. typhi</u>	D	9, 12	Man Rha Tyv
<u>S. sendai</u>		1, 9, 12	Man Rha Tyv
<u>S. enteritidis</u>		1, 9, 12	Man Rha Tyv

B, C₁, C₂, C₃, D₁, D₂, O y Z (13).

Staub y Tinelli en 1956 demostraron la capacidad que tienen ciertos azúcares provenientes del oligosacárido de repetición para inhibir reacciones de precipitación con polisacáridos de Salmonella. De estos trabajos concluyeron que la especificidad del antígeno 9 en *Salmonella typhi* estaba asociada a la presencia de tivelosa, mientras que la del antígeno 12 se debe a la ramnosa (13).

4. Métodos de extracción de lipopolisacáridos.

Boivin y Mesrobeanu en 1932 encontraron un procedimiento para extraer el complejo endotóxico de bacterias Gram negativa con ácido tricloroacético; resultando que los principales componentes de este producto son de naturaleza polisacáridica y lipídica con sólo pequeñas cantidades de proteína adicional.

En estudios similares, Morgan y Gosbel usando mezclas de solventes orgánicos y agua, obtuvieron productos purificados (similares a los productos de Boivin) constituidos por polisacáridos, lípidos y proteína.

Por otro lado, Murray, Shear y colaboradores (6), realizando estudios sobre necrosis tumoral inducida por endotoxinas, demostraron primero que el principio activo de estas bacterias Gram negativas reside en el complejo endotóxico y, se-

gundo; que este es un lipopolisacárido, el cual forma una dispersión coloidal en agua con el tamaño de las partículas del orden de algunos millones de nanómetros.

Más tarde, Westphal y Lüderitz en 1952 produjeron un lipopolisacárido libre de proteínas, aplicando el método de fenol-agua para las bacterias Gram negativa (14).

Después de la extracción por el método de Westphal, Galanos y colaboradores extrajeron lípido A a partir de un lipopolisacárido encontrando que la mayor parte de las actividades biológicas atribuidas a la endotoxina, residen en este lípido A (16).

5. Mecanismos de desintoxicación de endotoxinas.

Los primeros estudios que demostraron que la desintoxicación se llevaba a cabo por medio de un componente plasmático, los realizó Skarnes en 1958 (1), tiempo después, él mismo encontró que dos proteínas plasmáticas interactuaban con el lipopolisacárido de bacterias Gram negativas, la siderofilina y un alfa-lipoproteína. En 1980, Freudenberg y Galanos administrando endotoxina por vía intravenosa en animales de experimentación, encontrando que ésta persiste en la sangre por algún tiempo antes de que sea eliminada principalmente en el hígado (3). El tiempo en el cual la endotoxina circula en la sangre puede depender de algunos factores, como son, si la ce

pa de donde proviene la endotoxina es lisa o rugosa (20, 21), la dosis del lipopolisacárido usado (22), el método de extracción empleado, así como el estado de los animales usados. Los estudios sobre la distribución de los lipopolisacáridos en la sangre, mostraron que el lipopolisacárido circulante estuvo principalmente en el plasma (22, 23, 24). No se detectó en eritrocitos (23, 25), aún cuando algunos autores lo han detectado en plaquetas y en leucocitos polimorfonucleares. La desintoxicación que tiene lugar principalmente en el sistema retículo endotelial se postuló que tenía su inicio en el plasma.

El papel de las lipoproteínas de alta densidad como acarreadoras de lipopolisacáridos circulantes in vivo se ha investigado desde 1956 por Skarnes (26). En la época actual se les ha dado un papel primordial en la desintoxicación plasmática de endotoxinas.

6. Generalidades de lipoproteínas.

Las lipoproteínas son complejos micromoleculares de lípidos asociados a proteínas, lo cual les confiere la característica de ser soluble en agua. Las lipoproteínas están caracterizadas por una región externa de aproximadamente 15 nm de espesor atribuida a una cubierta de lípidos polares (fosfolípidos) y grupos proteícos, y un núcleo hidrofóbico interno constituido por triglicéridos y ésteres de colesterol.

Las interacciones de las lipoproteínas con enzimas y con algunos componentes celulares, están dadas por las propiedades de superficie de las partículas y por las movi- lidades de sus constituyentes moleculares. Entre las posibles consecuencias de cambios en las propiedades dinámicas de los lípidos se podrían citar, la separación lateral de fases, que pueden producir alteraciones en la cinética de inserciones moleculares y las translocaciones que pueden conducir a la fusión y/o agregación de lipoproteínas con ellas mismas o con otras moléculas y membranas (27).

Los lípidos y en especial los triglicéridos son menos densos que el agua, de aquí se deduce que a medida que aumenta la proporción de lípidos a proteínas en las lipoproteínas, la densidad disminuye. Se hace uso de esta propiedad para separar las diferentes lipoproteínas del plasma por ultracentrifugación. Las fracciones lipoproteicas separadas por ultracentrifugación son:

1. Quilomicrones
2. Lipoproteínas de muy baja densidad
3. Lipoproteínas de baja densidad
4. Lipoproteínas de alta densidad.

También pueden separarse de acuerdo a sus propiedades electroforéticas:

1. Quilomicrones

2. Lipoproteínas pre-beta
3. Lipoproteínas beta
4. Lipoproteínas alfa (28).

Las propiedades electroforéticas que presentan las lipoproteínas ha permitido que se analicen por métodos electroforéticos, los cuales a su vez han aumentado en sensibilidad hasta lograr técnicas cada vez mejores y reproducibles para el estudio tanto de las lipoproteínas como de otros componentes del plasma.

7. Inmunolectroforesis.

El análisis de la heterogeneidad de las proteínas individuales se lleva a cabo más fácilmente por electroforesis. La separación de las proteínas en un campo eléctrico la estableció Tiselius en 1937, empleando la electroforesis libre o de frontera móvil. No obstante, debido a la relativa complejidad de este método, la electroforesis de zona en un medio estabilizador como el papel o el acetado de celulosa ha reemplazado a la electroforesis libre para uso clínico.

En 1952 se describió un método de dos etapas que combinaba la electroforesis con la inmodifusión para la identificación del toxoide tetánico mediante el suero específico. Poco tiempo después, el método clásico de la inmunolectroforesis fue introducido por Williams y Grabar, en esta técnica,

la electroforesis y la doble inmunodifusión se hacen sobre la misma laminilla recubierta con agar. Durante los últimos 20 años, la inmunolectroforesis se ha vuelto fundamental para el análisis de proteínas en el campo de la medicina y la investigación (29). Las técnicas electroforéticas han sufrido un gran número de modificaciones; la migración del antígeno dentro de una capa uniforme de suero anti fué usada por Ressler en 1960 combinándolo con una electroforesis preliminar. Laurell utilizó una técnica similar la cual se llamó "electroforesis cruzada antígeno-anticuerpo", usando un suero específico (30). Este método consiste en una combinación de electroforesis simple en gel de agarosa y electroinmudifusión. La primera dimensión es una separación electroforética de una mezcla de proteínas, por ejemplo, un suero en un gel de agarosa libre de sueros antiespecie. Durante la segunda dimensión, en contraste a la inmunolectroforesis de Grabar, la inmunoprecipitación tiene lugar en un gel de agarosa conteniendo un suero oligoespecífico o poliespecífico (31).

La velocidad con que se desplazan las moléculas, está determinada, entre otros factores, por su carga neta, forma, tamaño, etc.. Así, una partícula de mayor carga, se moverá a mayor velocidad que otra que posee una carga menor y los componentes con poca o ninguna carga, permanecerán estacionarios. A su vez, la carga neta depende del pH de la solución amortiguadora en la que se encuentra el sistema. El estado iónico de la solución amortiguadora es de gran importancia en

la electroforesis, ya que las soluciones amortiguadoras de baja fuerza iónica permiten velocidades de migración más rápidas y poco desprendimiento de calor, mientras que los de fuerzas iónicas altas, si bien ayudan a mejorar la definición de las zonas, ocasionan una producción mas alta de calor y velocidades de migración mas lentas (32).

La agarosa es un polímero lineal, compuesto por unidades alternadas de D-galactosa y de 3, 6-anhidro-L-galactosa, enlazadas por uniones alfa-1, 3 y beta-1, 4 (33). Tiene la propiedad de secarse formando membranas delgadas, transparentes e incoloras que, una vez teñida, son ideales para su valoración. Cuando se emplea agarosa como medio de soporte en la electroforesis, son determinantes entre otros, la concentración a la que se emplea el gel y el grosor del mismo, ya que en este caso, una buena resolución depende de las dimensiones de los poros formados por la matriz del gel al crear un efecto tamizante (34).

III. METODOLOGIA

El lipopolisacárido (endotoxina) de S. typhi y las -- fracciones de éste: polisacárido y lípido A, se obtuvieron en el Laboratorio de la División de Inmunoquímica de la Unidad - de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional y fue-- ron objeto de otro trabajo de investigación (35, 36), las --- fracciones así obtenidas se diferenciaron por métodos físicos y químicos, por lo que aquí sólo se mencionará las técnicas - que se utilizaron para la obtención de estas fracciones.

1. Cultivo de la bacteria.

1.1. Cepa utilizada.

Salmonella typhi, con los determinantes antigénicos - 9, 12 de acuerdo a la clasificación de Kauffmann y White, de la colección de laboratorio de Inmunoquímica.

Esta bacteria se cultivó en el siguiente medio sólido:

Extracto de corazón de buey.....	500 g
Peptona.....	10 g
Cloruro de sodio.....	5 g
Agar	25 g

Se reconstituyó el medio en agua destilada, en una -- proporción de 40 g/l colocándose en tubos de ensayo; se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos y se colocó en forma inclinada para solidificarlo. El cultivo de las bacterias en este medio permitió su identificación como colonias de aspecto liso.

1.2. Preparación del inóculo.

Se tomó una asada de varias colonias cultivadas en el medio anterior y se suspendieron en un medio de cultivo líquido con:

Extracto de cerebro	200 g
Extracto de corazón de buey	200 g
Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato disódico	2 g

Este medio se reconstituyó con agua destilada, en una proporción de 37 g/l, se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Se dejó 48 horas en incubación comprobándose su esterilidad. Una vez finalizado el --- tiempo de incubación, de este cultivo se utilizó para inocu-- lar botellas de Roux.

Se utilizó el medio de cultivo anterior añadido de --

agar al 1% para favorecer su solidificación.

El medio reconstituido en agua destilada, se colocó en cantidades aproximadas de 100 ml en cada botella, las que se esterilizaron, se les dejó solidificar y se colocaron en la incubadora a 37°C durante 48 horas para asegurar su esterilidad.

En estas condiciones se inocularon varios lotes de botellas (2 ml de cultivo por botella) hasta completar 200: después de 18 horas de incubación a 37°C se cosechó el crecimiento obtenido en solución salina isotónica.

1.3. Cosecha.

Una vez retirado el tapón de las botellas en condiciones asepticas, se introdujeron 25 ml de solución salina isotónica, se movilizó hasta desprender todas las colonias y se pasó a un matraz estéril; el lavado se repitió en dos ocasiones.

Se centrifugó la suspensión de bacterias a 5 000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el sedimento se lavó tres veces con solución salina isotónica hasta obtener bacterias libres de medio de cultivo. Para inactivarlas, se empleó acetona peso a volumen. La suspensión de bacterias muertas en acetona se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se -

resuspendió en acetona (p/v). El proceso anterior se repitió tres veces y el sedimento obtenido en la última centrifugación se colocó en cajas de Petri y se secó a 37°C.

2. Extracción de lipopolisacárido.

(Método de Westphal y Jann) (37).

El fenol se conoce como un excelente solvente para muchas proteínas. El coeficiente de partición de mezclas bifásicas de fenol y agua efectúan una extracción de proteínas en solución acuosa bajo condiciones controladas de pH y fuerza iónica en un solo paso de reacción. En contraste, los polisacáridos, monopolisacáridos, lipopolisacáridos y ácidos nucleicos, son generalmente solubles en agua, pero insolubles en fenol, pueden precipitarse varios polisacáridos de la solución acuosa, por adición de fenol líquido. El fenol es un ácido débil, la constante de disociación a 18-19°C en agua es $1.1-1.2 \times 10^{-10}$. Las mezclas de fenol y agua tienen una constante dieléctrica alta. Estos hechos forman las bases de un método de partición de proteínas y polisacáridos y/o ácidos nucleicos entre fenol y agua.

Para la técnica, se suspenden aproximadamente 20 g -- de Salmonella typhi (bacteria seca) en 350 ml de agua a 90°C, se añaden 350 ml de fenol al 90% previamente calentado a 65-68°C con agitación vigorosa y se coloca en un baño maría por 15 minutos a 65-68°C. Posteriormente se enfría a 10°C en un-

baño de hielo, la emulsión se centrifuga a 3 000 rpm por 30--45 minutos, lo cual resulta en la formación de tres capas: -- una capa acuosa, una capa fenólica y un residuo insoluble, algunas veces, al final se forma una capa en la interfase fenol agua. La fase acuosa se separa, y la capa fenólica y la insoluble se tratan a 65-68°C con otros 350 ml de agua como se -- describió anteriormente. Los extractos combinados de la fase acuosa se dializan por 3 ó 4 días contra agua destilada para eliminar el fenol y pequeñas cantidades de sustancias bacterianas de bajo peso molecular. El dializado es una solución ligeramente opalescente, que contiene el lipopolisacárido y RNA; esta mezcla se concentra a 35-40°C a presión reducida a tener un volumen aproximado de 100 ml. Después se centrifuga para eliminar el material insoluble y la solución acuosa se liofiliza dando 1.6-2.0 g.

Para eliminar el RNA bacteriano, al extracto crudo -- liofilizado se le añade agua para dar una solución al 3% la cual se centrifuga por 6-8 horas a 20 000 rpm. El sedimento se resuspende en agua y la solución se recentrifuga por 2 ó 3 veces a 33 000 rpm durante 3 horas cada vez. El sedimento final se resuspende en una cantidad mínima de agua y se liofiliza dando 300-500 mg.

3. Extracción del polisacárido

(Freeman) (15).

Para obtener un polisacárido puro, es necesario hidro

lizar el complejo de las células secas tratadas con ácido acético 0.1 N, algunas veces es necesario usar ácido acético 1N. Este procedimiento fué usado por White, y modificado posteriormente por Freeman quien aisló el polisacárido con un alto grado de pureza.

Para realizar la técnica, se pesaron 15 g de bacterias secas y se suspendieron en 90 ml de agua, adicionándose 10 ml de ácido acético 1N. Esta suspensión se colocó en agua a 100°C durante 90 minutos. Una vez fría la suspensión, se centrifugó a 5 000 rpm durante 1 hora, obteniéndose un precipitado que se llamará A y un sobrenadante A. El precipitado se resuspendió en 90 ml de agua destilada y se añadieron 10 ml de ácido acético 1N.

2a. hidrólisis acética en las mismas condiciones anteriores:

Centrifugación a 5 000 rpm durante 30 min.

Precipitado B

Sobrenadante B

Resuspensión en 90 ml de agua destilada, añadir 10 ml de ácido acético, 1N.

3ra. hidrólisis en las mismas condiciones anteriores:

Centrifugación a 5 000 rpm/ 30 min.

Precipitado CSobrenadante C

Concentración: Se reunieron los sobrenadantes A, B, y C, y se evaporaron durante 30 minutos en un rotavapor. El sedimento seco quedó adherido a las paredes del matraz, se disolvió en 25 ml de agua destilada, se centrifugó a 5 000 rpm durante 30 minutos, el sedimento se descartó y se utilizó el sobrenadante en las siguientes precipitaciones alcohólicas:

1ra. precipitación con un volumen de alcohol etílico:

El sobrenadante anterior se llevó a 25 ml de agua ---estilada, se adicionó el mismo volumen de alcohol etílico y se dejó reposar durante 1 noche.

Centrifugación a 5 000 rpm/ 30 min.

Precipitado ASobrenadante B

Se disolvió en 25 ml de agua destilada.

(50 ml)

1ra. precipitación con 5 vol. de alcohol etílico:

Al precipitado disuelto se llamó A y se le adicionaron 125 ml de alcohol etílico.

Al sobrenadante se le llamó B y se añadieron 225 ml de alcohol etílico.

Reposo durante 10 horas.

Centrifugación a 5 000 rpm/ 30 min.

Precipitado <u>A</u>	Sobrenadante <u>A</u>	Precipitado <u>B</u>	Sobrenadante <u>B</u>
Se disolvió en		Se disolvió en	
50 ml de agua	(se descartó)	50 ml de agua	(se descartó)
destilada		destilada.	

Reposo 20 horas a 4°C.

2a. precipitación a 1 vol de alcohol:

Centrifugación a 5 000 rpm/ 30 min.

Precipitado <u>A</u>	Sobrenadante <u>A</u>	Precipitado <u>B</u>	Sobrenadante <u>B</u>
Se disolvió en		Se disolvió en	
20 ml de agua	(se obtuvieron	20 ml de agua	(se obtuvieron
	100 ml)	100 ml).	
destilada		destilada	

Unión de precipitados: Unión de sobrenadantes:

$A + B = C$

$A + B = D$

2a. precipitación con 5 vol de alcohol:

A los precipitados disueltos <u>C</u>	A los sobrenadantes <u>D</u> se
se añadieron 200 ml de alcohol	añadieron 900 ml de alcohol
etílico.	etílico.

Reposo 24 horas a 4°C.

Centrifugación a 5 000 rpm/ 30 min.

Los sobrenadantes y precipitados se trataron en la -- misma forma hasta tener 5 precipitaciones con 1 vol de alcohol y 5 precipitaciones con 5 volúmenes de alcohol después de la última precipitación con 5 volúmenes de alcohol, se procedió a las precipitaciones acéticas.

1ra. precipitación acética:

Los precipitados provenientes de C se disolvieron en 80 ml de agua destilada

Los precipitados provenientes de D se disolvieron en 60 ml de agua destilada.

Los sobrenadantes C y D se descartaron

Ambos se precipitaron con ácido acético al 97%

Sol. C (80 ml)

A esta solución se añadieron 1 252 ml de ácido acético glacial.

Sol. D (60 ml)

A esta solución se añadieron 939 ml de ácido acético glacial.

Centrifugación a 5 000 rpm/ 30 min.

Precipitado C
Se disolvió en

Sobrenadante C

Precipitado D Sobrenadante
Se disolvió en D

	Se descartó		Se descartó
44.7 ml de agua		25 ml de agua	
destilada		destilada	

2a. precipitación con ácido acético 98%.

A la solución del precipitado A se le adicionaron 699 ml de ac <u>i</u> do acético glacial.	A la solución del precipitado se le adicionaron 391 ml de ácido acético glacial.
---	--

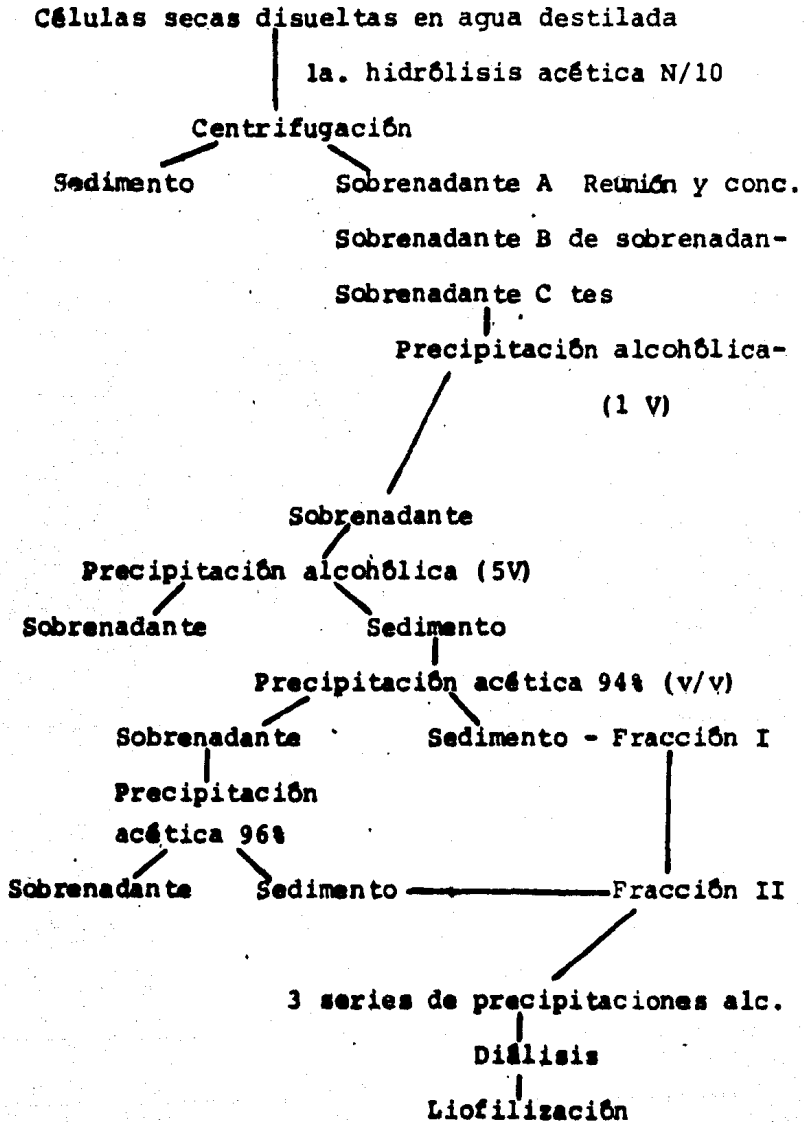
Centrifugación a 5 000 rpm/ 30 min.

Precipitado	Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante
Se disolvió		Se disolvió	
en 50 ml de agua destilada.	Se descartó	en 30 ml de agua destilada. Se descartó	

Los precipitados disueltos en agua destilada se utilizaron para llevar a cabo tres series de precipitaciones alcohólicas con 1 volumen y con 5 volúmenes de etanol, siguiendo el protocolo anterior.

Al finalizar la última precipitación con 5 volúmenes de alcohol, los precipitados obtenidos se disolvieron en agua destilada durante 8 recambios sucesivos cada 8 horas, para finalmente liofilizarlo el polisacárido puro. En la siguiente página se muestra una esquema que sintetiza este proceso.

OBTENCION DEL POLISACARIDO



V- volúmenes

4. Preparación y purificación de lípido A (36).

Las formas lisas de las bacterias Gram negativas son más deficientes en lípido A que las formas rugosas, las cuales están presentes sobre la pared celular de esas bacterias y pueden aislarse por una gran variedad de procedimientos.

La composición del lípido A y las porciones nucleares de lipopolisacáridos se reportaron por Fromme y Schlecht como independientes de las condiciones de cultivo, no así su porción polisacarídica cuya longitud puede variar bajo diferentes condiciones.

El principio endotóxico de los lipopolisacáridos está localizado en su lípido A. En contraste a la gran variabilidad de las cadenas O específicas, la estructura química del lípido A es mucho más constante.

En esta técnica se efectuó una extracción del lípido A de formas bacterianas rugosas por el método de fenol-cloroforno éter de petróleo.

Este procedimiento de extracción se usó en este estudio, particularmente con Salmonella minnesota Re 595, la cual representa una fuente rica de lípido A. La bacteria seca se suspendió en una mezcla de fenol (90 g en 11 ml de agua), cloroforno y éter de petróleo en una relación de 2:5:8. Esta suspensión se homogenizó por un período corto de 50 s. Después de la centrifugación, el sedimento se re-extrajo dos ve-

ces, los sobrenadantes colectados con cloroformo y éter de petróleo se eliminaron en un rotavapor (40°C). Al fenol sobrante se le adicionó agua gota a gota hasta que precipitó el lipopolisacárido. Se centrifugo, se lavó 2 veces con fenol al 75% y tres veces con acetona. El material seco se disuelve en agua destilada y se centrifuga a 30 000 rpm durante 4 horas. El sedimento se redisuelve en agua destilada y se liofiliza.

4.1. Electrodialisis del lipopolisacárido:

Las preparaciones de lipopolisacáridos contienen iones divalentes, tales como Mg^{++} , Ca^{++} y aminas básicas, tales como espermina, espermidina, cadaverina, putrescina y lisina. Su presencia afecta las propiedades biológicas y fisicoquímicas del lipopolisacárido y del lípido A derivado de él. El papel de la electrodialisis es eliminar primero la mezcla de iones y entonces reemplazarlos por un ión sencillo.

La electrodialisis de los lipopolisacáridos se llevó a cabo por el método de Galanos (19) en un aparato que contiene tres cámaras separadas por membranas de diálisis, con electrodos en las cámaras externas y el lipopolisacárido en el centro. El pH (7.2) se mantiene constantemente por lo que se neutraliza continuamente la cámara central, la cual se enfría con aire frío circulante. El contenido de la cámara se renue

va dos veces en una hora. La diálisis se detiene cuando el pH de la cámara no cambia a alcalino (después de pocas horas a 40 mA). El lipopolisacárido resultante, ahora presente en la forma de ácido libre, se convierte a una forma soluble por su neutralización con álcali o amino como trietilamina.

El lipopolisacárido electrodiálizado se hidroliza en 80 ml de ácido acético al 1% a 90°C durante 90 minutos. Después se centrifuga y el sobrenadante se elimina, el lípido A se lava una vez con 20 ml de ácido acético caliente al 1%, -- dos veces con HCl, una con agua y

5. Muestras de trabajo.

Para este trabajo se emplearon 30 ratas de la raza -- Long-Evans divididas en grupos de 10, con pesos que oscilaron entre 300 y 350 g.

5.1. Plasma de ratas tratadas con lipopolisacárido.

Las muestras se obtienen por cateterización de la vena femoral; se le extrae a la rata 1 ml de sangre y se coloca en un tubo que contiene heparina; se le inyectan a la rata al través del catéter, 5 mg de lipopolisacárido de S. typhi en 0.5 ml de agua destilada estéril, libre de pirógenos y se toman muestras a los 5, 15, 30 y 60 minutos después de la ino-;

culación y siguiéndose el mismo procedimiento para la obtención del plasma, se guarda a -70°C hasta su uso.

5.2. Plasma de ratas tratadas con polisacárido de Freeman.

La obtención de las muestras para comprobar el efecto del polisacárido de S. typhi, se lleva a cabo de la misma manera, es decir, por cateterización; se toma una muestra testigo y se inyectan 5 mg de polisacárido en 0.5 ml de agua destilada estéril libre de pirógenos y las muestras siguientes se toman a los 2, 5 y 7 minutos después de la inoculación y siguiéndose el mismo procedimiento para la obtención del plasma, se guarda a -70°C hasta su uso.

5.3. Plasma de ratas tratadas con lípido A.

Las muestras de las ratas tratadas con lípido A también se obtuvieron por cateterización; se toma la muestra testigo y se inyectan 60 μg en 0.5 ml de una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7.2 y se solubiliza con una pequeña cantidad de trietilamina; se toman las otras muestras por cateterización a los 5, 15, 30 y 60 minutos, se separa el plasma y se guarda en congelación.

6. Obtención de suero anti-rata obtenido en conejo.

Para obtener el suero anti-rata, se sangra un grupo de 10 ratas Long-Evans por punción cardíaca, se deja reposar la sangre por 24 horas para retraer el coágulo, se separa el suero y se congela en alícuotas de 1 ml cada una.

Se diluye el suero 1:2 con solución salina isotónica-estéril al 0.9% y se sigue el siguiente esquema de inmunización:

Conejo Nueva Zelanda macho de 3 Kg.

Día	Suero de rata	Vía de administración
1	1 ml en ACF (1:1)	Intradérmica
7	1 ml en AIF (1:)	Intradérmica
14	0.5 ml de suero	Intravenosa
15	1.0 ml de suero	Intravenosa
23	Punción cardíaca	

7. Inmunolectroforesis cruzada (4).

Procedimiento.

1a. Dimensión.

1. 15 ml de solución de agarosa al 1% preparada en -- una solución amortiguadora de barbital pH 8.6, $\mu=0.02$, esta - solución caliente se coloca sobre una placa de vidrio (8.5 X- 9.5 cm X 1.5 mm), la cual se coloca sobre una mesa horizon- - tal.

Preparación de la solución amortiguadora:

Tris (hidroximetilaminometano)	4.43 g
Acido dietilbarbitúrico	2.24 g
Azida de sodio	0.065 g
Lactato de calcio	0.053 g

Se disuelve en 500 ml de agua destilada, y se ajusta- el pH a 8.6 con un potenciómetro.

2. Después de la solidificación de la agarosa, se -- procede a la formación de pozos sobre la agarosa, con un diá- metro de 4 mm.

3. Las muestras se aplican por medio de una pipeta-- de constricción doble (1-10 ul).

4. La placa con el gel se coloca en la cámara elec-- troforética, conectándose al amortiguador (mencionado con anterioridad) por medio de puentes de papel y se conecta el flujo continuo de agua a 4°C.

5. La electroforesis en la primera dimensión se lleva a cabo a 250 V en 90 minutos.

La colocación de la placa en la cámara electroforética se muestra en la figura 5a.

2a. Dimensión.

6. Se detiene la electroforesis y se procede a cortar los diferentes canales al través de los cuales corrió la ---- muestra.

7. Se transfiere la parte del gel que se cortó y se coloca sobre otra placa de vidrio del mismo tamaño, la cual se coloca sobre una mesa horizontal, a la parte sobrante de la placa de vidrio se le añade el suero anti-rata obtenido en conejo (300 ul) en 9 ml de agarosa al 1% a una temperatura -- aproximada de 50°C para evitar desnaturalización de las proteínas del suero.

8. Se deja solidificar el gel, se coloca en la cámara

ra electroforética y se conecta con puentes de papel a la solución amortiguadora.

9. La electroforesis en la segunda dimensión se lleva a cabo a 90 V por un período de 18-22 horas. El esquema de esta segunda dimensión se muestra en la figura 5b.

7.1. Lavado y secado de las placas.

10. Se quitan las placas de la cámara electroforética y se presionan con tres capas de papel filtro, un papel secador y otra placa de vidrio y se les coloca encima un peso de aproximadamente 15 minutos.

11. Después de presionar, se lavan con una solución de cloruro de sodio 0.1 N por un período de aproximadamente 8-10 días, cambiando la solución diariamente.

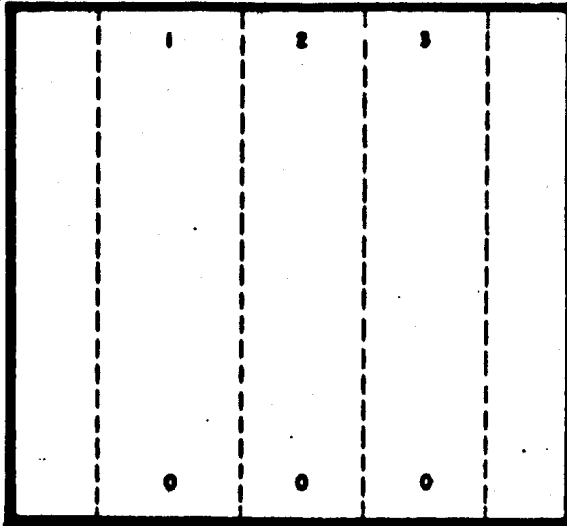
12. Se hace un lavado posterior con agua destilada -- por aproximadamente 4 horas.

13. Se presiona nuevamente el gel de la misma forma que en el paso No. 10 y se seca en una estufa a 50°C.

7.2. Teñido de las placas.

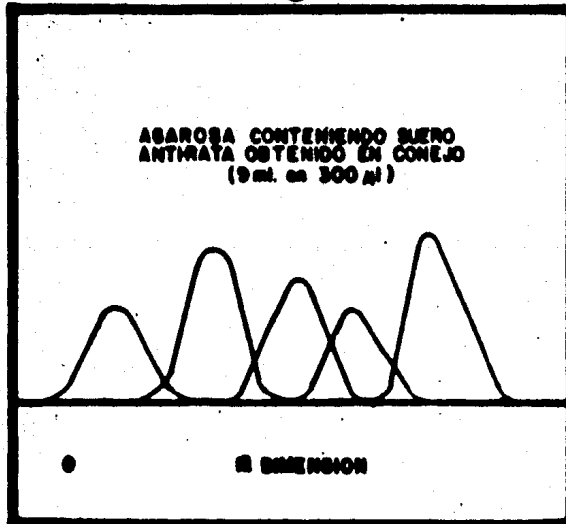
14. Ya secas las placas, se tiñen con azul de Coomassie brillante por un período de 10 minutos.

a) 1ª DIMENSION



AGAROSA AL 1%
CORRIENTO A 250V/90min./4°C
1, 2, 3= MUESTRAS PROBLEMA

b) 2ª DIMENSION



CORRIENTO A 60V/10-22 hrs./4°C

Fig. 5: INMUNELECTROFORESIS CRUZADA

Preparación del colorante:

Azul de Coomassie brillante	2.0 g
Etanol	130ml
Acido acético glacial	40 ml
Agua destilada	180ml

Se hace una mezcla de etanol, ácido acético y agua, - se le adiciona el colorante en polvo, y se mezcla; se deja reposar por 24 horas y se filtra.

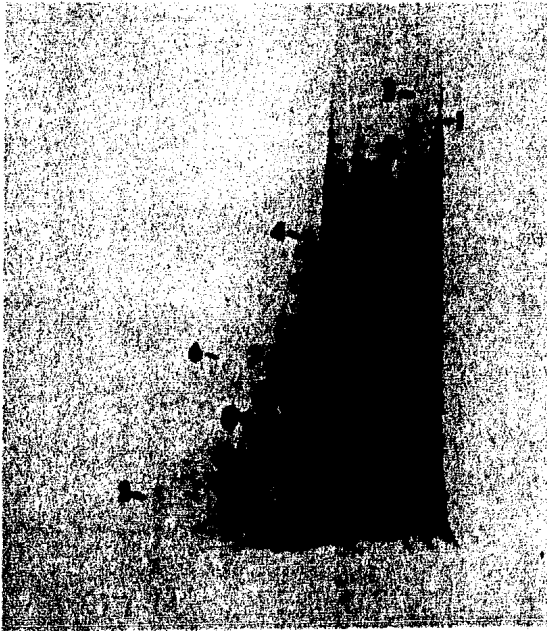
15. Las placas se destiñen con una solución decolorante en periodos de 15 minutos. La solución decolorante con tiene los siguientes reactivos:

Etanol	180 ml
Acido acético glacial	40 ml
Agua destilada	180 ml

IV. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Las muestras se analizaron por medio de la inmuno-electroforesis cruzada, posteriormente se efectuó una tinción para proteínas.

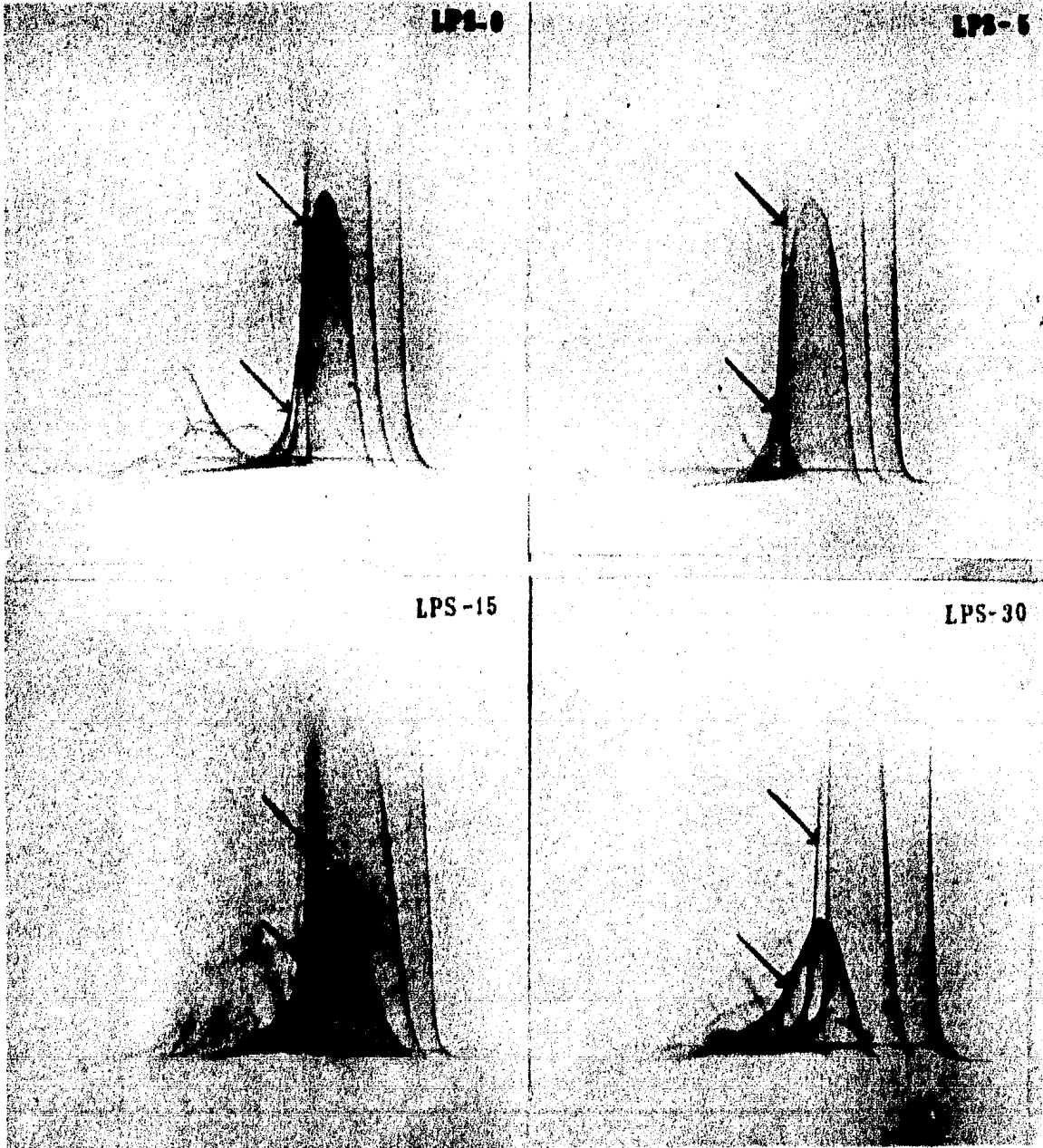
Para poder analizar los resultados se requiere de un patrón de bandas, aquí se mencionan algunas de las bandas que son de mayor importancia para este trabajo:

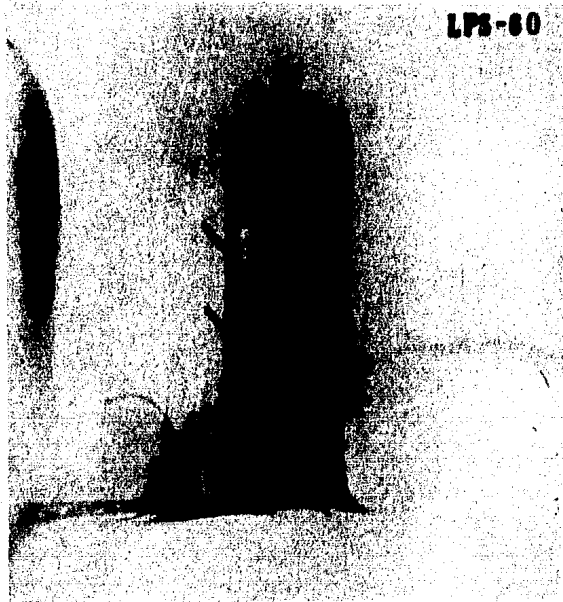


1. Albúmina
2. Siderofilina
3. Alfa₁-lipoproteína
4. Alfa₁-antitripsina
5. IgG
6. Transferrina
7. Ceruloplasmina
8. Hemopexina

Los resultados se analizarán con respecto a la movilidad electroforética y a la forma física que toman estas bandas durante el tratamiento.

1. Demostración de la interacción del lipopolisacárido de S. typhi con proteínas plasmáticas.

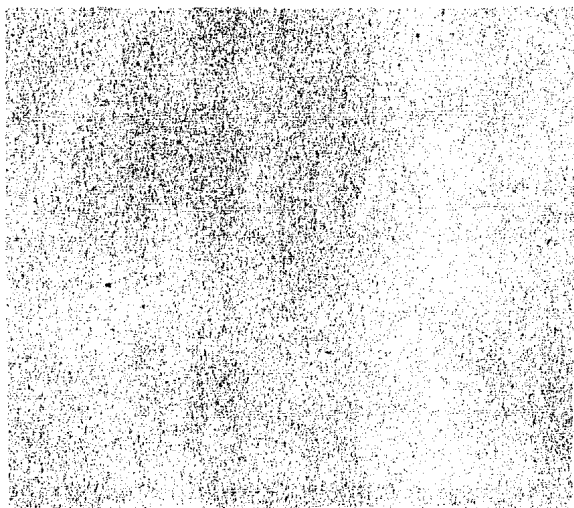




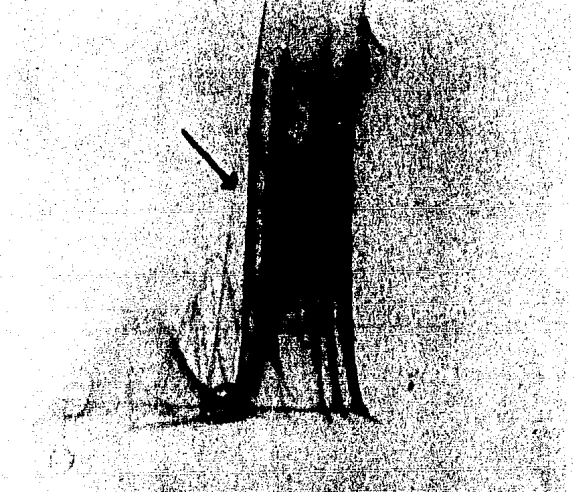
Como podemos observar en los resultados, la interacción lipopolisacárido-proteínas plasmáticas se observa con más claridad en 15 y 30 minutos, tiempo en el cual empiezan a observarse modificación en la movilidad electroforética de 2-proteínas: la siderofilina y la α_1 -lipoproteína como se muestra por medio de flechas; se toma como referencia la banda de la albúmina, ya que la siderofilina y la α_1 -lipoproteína presentan movilidad electroforética similar a la de la albúmina en un testigo negativo. Observándose esta modificación hasta los 60 minutos después de la introducción de la endotoxina.

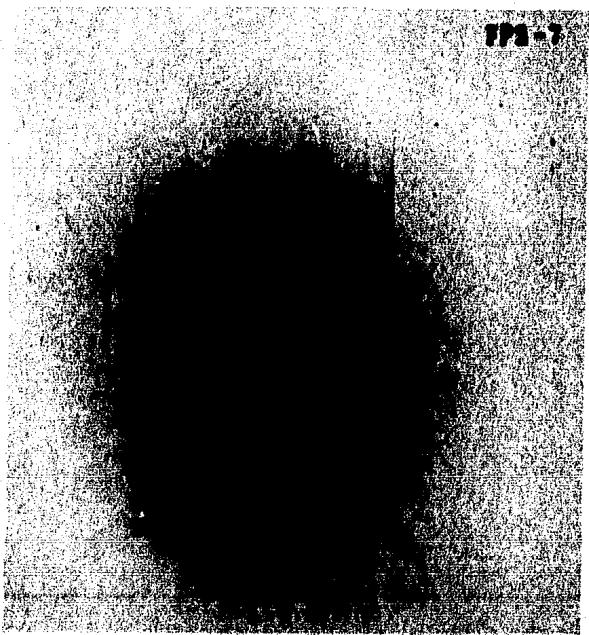
2. Demostración de la interacción del polisacárido de S. typhi con proteínas plasmáticas.

La interacción de las proteínas plasmáticas con el polisacárido de S. typhi, como se observa en los resultados espor un período de tiempo muy corto, esta fracción de la entoxi na se liga a una alfa₁-antitripsina lo cual se observa por la modificación electroforética que sufre esta proteína.

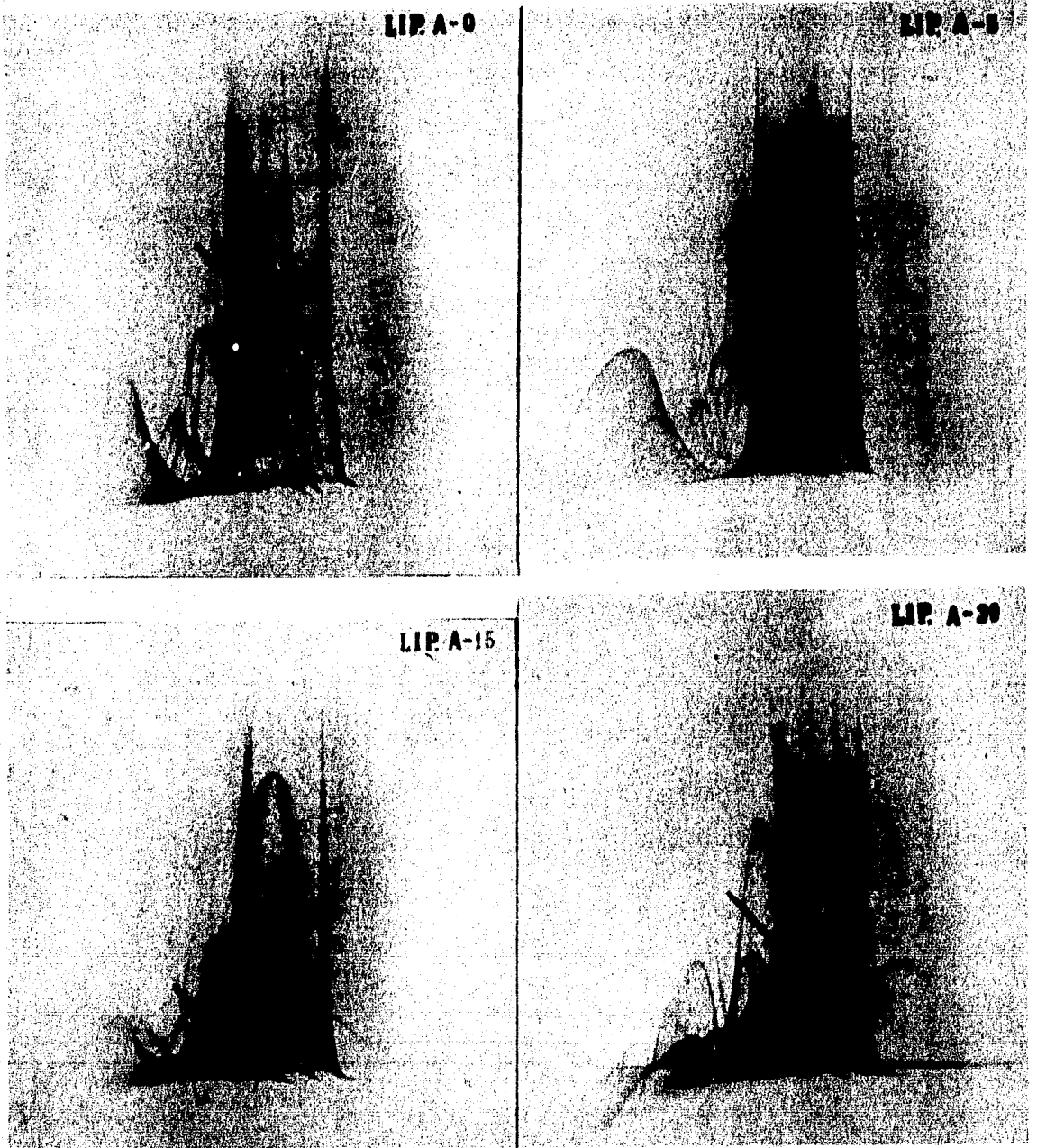


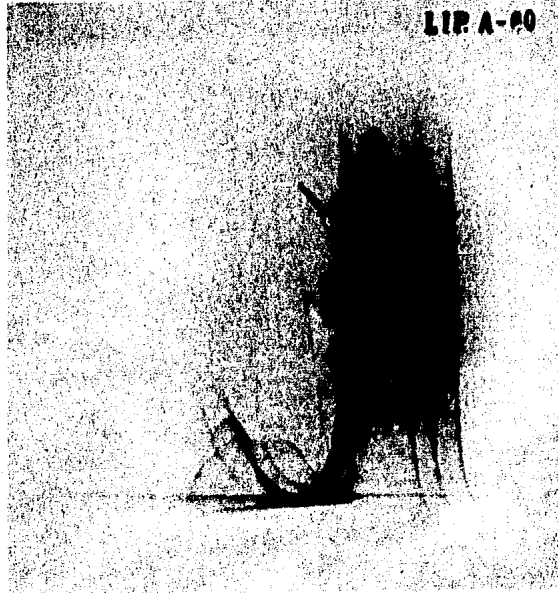
PPS-2





3. Demostración de la interacción del lípido A
con proteínas plasmáticas.





Como se puede observar en estos resultados, el lípido A interacciona únicamente con la lipoproteína de alta densidad, la reacción es mas visible a los 15 minutos en los cuales, la lipoproteína presenta movilidad variada con respecto a su posición original, además de la disminución en su concentración. El tiempo que permanece ligado el lípido A a la lipoproteína de alta densidad es similar al del lipopolisacárido total y esta interacción se inicia con el contacto del lípido A con esta proteína plasmática.

V. DISCUSION DE RESULTADOS Y CONCLUSION

De los resultados mostrados podemos inferir que, como ya se había observado en revisiones anteriores (39, 40) que el lipopolisacárido (endotoxina) interactúa con una lipoproteína de alta densidad y una siderofilina cuando éste se encuentra en plasma; esta endotoxina se une a estas proteínas plasmáticas desde el momento en que se pone en contacto con el plasma circulante y deja de interactuar en el momento en que se agota del plasma para ser eliminado por órganos del sistema retículo endotelial.

El hecho de que la interacción de la fracción polisacáridica con la alfa₁-antitripsina sea por un período muy corto, nos lleva a proponer que esta interacción es por afinidad inespecífica, ya que la molécula a la que se une el polisacárido es una glicoproteína que muestra cierta afinidad probablemente al través de la fracción polisacáridica.

El polisacárido es la fracción antigénica de la endotoxina y aparentemente cuando es inyectado solo a las ratas, no juega un papel importante en los mecanismos intrínsecos de desintoxicación. Sin embargo, como parte integral de la molécula sí es muy importante ya que interviene como acarreador de la fracción lipídica en el proceso de la desintoxicación -

tanto plasmática como sistémica (41).

Por otro lado, las formas de unión del lípido A a la lipoproteína de alta densidad puede explicarse de diversas formas, pero una hipótesis viable es la siguiente: la lipoproteína de alta densidad está formada por dos superficies, una interna formada por grupos no polares, en la que se encuentra el colesterol y los triglicéridos y una capa externa en la que se encuentran grupos polares que son las proteínas y los fosfolípidos. Las proteínas que se encuentran en la parte externa de la lipoproteína al pH al que se está trabajando (8.6) se encuentran cargadas negativamente, razón por la cual como tal puede migrar hacia el ánodo.

El lípido A que está compuesto entre un 40 y 60% de 4-L-aminoarabinosa, un azúcar aminado, puede unirse a la alfa₁ lipoproteína modificándola al disminuir ciertas cargas negativas netas disminuyendo su densidad electrónica (17).

Los grupos negativos de los fosfolípidos así como los grupos cargados negativamente del líquido A pueden unirse por medio de cationes existentes en el plasma, como es el caso del calcio, de tal manera que disminuye la densidad electrónica de la lipoproteína; a lo anterior hay que agregar que la formación del complejo varía ya sea en la estructura de la lipoproteína o en su conformación de tal manera que la modifica también en su peso molecular.

Que el ión calcio juegue un papel importante en el -- proceso de desintoxicación plasmática, es debido a los resultados obtenidos en algunos trabajos (40, 41), en los cuales se ha encontrado disminución del calcio plasmático del huésped con choque endotoxémico. A medida que la endotoxina está circulando por el plasma disminuye notablemente la concentración de calcio.

Conclusión: con estos resultados se demuestra que la endotoxina se une a la lipoproteína de alta densidad por su fracción lipídica.

El estudio de los mecanismos por medio de los cuales el huésped animal transporta, modifica y degrada estas importantes moléculas es sólo el inicio de un amplio campo de investigación.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Skarnes, R.C., F. Rosen, M. Shear and M. Landy. 1958.
Inactivation of endotoxin by a humoral component.
J. Exp. Med. 108: 685-699.
2. Torroella, J.M. Pediatría. 1a. Edicion. Ed. Méndez
Oteo. México 1977. p. 375-381.
3. Freudenberg, M.A., T.C. Bog-Hansen, U. Back and C.
Galanos. 1980. Interaction of lipopolysaccharides
with plasma high density lipoproteins in rats. Infect.
Immun. 28: 373-380.
4. Weeke, B. 1973. Crossed immunoelectrophoresis. p. 47-56.
En: N.H. Axelsen, J. Kroll, and B. Geeke (ed.). A manual
of quantitative immunoelectrophoresis, methods and appli-
cations. Universitetsforlaget, Oslo-Bergen-Tromso.
5. Kumate, J. y G. Gutiérrez: Fiebre tifoidea. En: Manuel -
de Infectología. 4a. ed. Ediciones Médicas del Hospital-
Infantil de México. México, D.F. 1976. p. 11-22.
6. Westphal O., U. Westphal and T. Sommer. The history of
pirogen research. En: Microbiology 1977. American So-
ciety for Microbiology. Washington, D.C. p. 221-235.
7. Lüdertitz, O. Endotoxins and other cell wall components
of Gram negative bacteria and their biological acyivi-

- ties. Microbiology 1977. American Society for Microbiology. Washington, D.C. p. 239-246.
8. Costerton, J.W. and Ingram. 1974. Structure and function of the cell envelope of Gram negative bacteria. Bacterial Revs. 28: 87-110.
 9. Westphall O. 1975. Bacterial endotoxins, En: 10th. Symp. Copenhagen, Int. Archs. Allergy appl. Immun. 49: 1-43.
 10. Rogers, H.I., H.R. Perkins, J.B. Ward. 1980. Microbial cell walls and membranes. London. Chapman and Hall Ltd. p. 407.
 11. Davis, B.D. y Dubelco. Salmonellas. En: Tratado de Microbiología. Barcelona (España). Salvat Editores, 1977 p. 783.
 12. Braun, V. 1969. Chemical characterisation, spatial distribution and function of lipoprotein (murein lipoprotein) of the E. coli cell wall. Eur. J. Biochem. 10: 426-438.
 13. Cummins, C.S. Immunochemical specificity and the location of antigens in the bacterial cell. En: Microbial classification. 20th. Symposium of the Society for General Microbiology. University Press, London 1962. p. 212-239.
 14. Kauffman F. Classification of bacteria. 1st. edition. - Munksgard editorial, Denmark, 1975

15. Staub, A.M. Somatic degraded polysaccharide of Gram negative bacteria. En: Methods in Carbohydrate Chemistry. Vol. 5. General Polysaccharide. Academic Press, N.Y. London 1965. p. 83-91.
16. Nowotny A. Relation of structure to function in bacterial endotoxins. En: Microbiology 1977. American Society for Microbiology. Washington, D.C. p. 247-252.
17. Rietschel, E.T., S. Hase, M-T. King, J. Redmond and V. Lehman. Chemical structure of lipid A. En: Microbiology. Washington, D.C. p. 262-268.
18. Galanos, C., M. Freudenberg, S. Hase, F. Jay and E. Ruschman. Biological activities and immunological properties of lipid A. En: Microbiology 1977. American Society for Microbiology. Washington, D.C. p. 269-276.
19. Galanos, C., and O. Luderitz. 1975. Electrodialysis of lipopolysaccharides and their conversion to uniform saltforms. Eur. J. Biochem. 54: 603-610.
20. Chedid, L., M. Parant and F. Boyer. 1966. Localisation and fate of ⁵¹Cr-labelled somatic antigens of smooth and rough Salmonellae. Ann. N.Y. Acad. Sci. 133: 712-726
21. Hofman, J. and V. Dlabac. 1974. The role of lipid A in phagocytosis of Gram negative bacteria and their lipopolysaccharides. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. - 18: 447-453.

22. Carey, F.J., A. Braude, and M. Zalesky. 1958. Studies with radioactive endotoxin. III. The effect of tolerance on the distribution of radioactivity after intravenous injection of E. coli endotoxin labelled with Cr⁵¹. J. Clin. Invest. 37: 441-457.
23. Braude, A.J., J. Carey, D. Sutherland, and M. Zalesky. 1955. Studies with radioactive endotoxin. II. Correlation of physiologic effects with distribution of radioactivity in rabbits injected with lethal doses of E. coli endotoxin labelled with radioactive sodium chromate. J. Clin. Invest. 34: 858-866.
24. Chedid, L., R.C. Skarnes and M. Parant. 1963. Characterisation of a Cr⁵¹-labelled endotoxin and its identification in plasma and urine after parenteral administration. J. Exp. Med. 117: 561-571.
25. Herring, W.B., J.C. Herion, R.I. Walker and J.G. Parmer. 1963. Distribution and clearance of circulating endotoxin. J. Clin. Invest. 42: 79-87.
26. Skarnes, R.C. 1966. The inactivation of endotoxin after interaction with certain proteins of normal serum. Ann. N.Y. Acad. Sci. 133: 644-662.
27. Scanu, A.M., R.W. Wissler and Godefrey. The biochemistry of atherosclerosis. The biochemistry of disease. Vol 7.- Marcel Dekker. N.Y. 1979.

28. Crivelli Chicato M. Valores de referencia de las apolipoproteínas A y B en sujetos clínicamente sanos y en pacientes con aterosclerosis. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana. Orizaba, Ver. 1982.
29. Fudenberg, H.H., D. Stites, J.L. Caldwell and J.V. Wells. Manual de Inmunología Clínica. 2a. edición. Ed. El Manual Moderno. México 1980, p. 383-385.
30. Clarke, H.G., and T. Freeman. 1968. Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins. Clin Sci. 35: 403-413.
31. Becker, W. Methods of quantitative and qualitative immunoelectrophoresis. Farbwerke Hoechst AG. Behring Department Behring. p. 15-16.
32. Cawley, L. Electrophoresis and immunoelectrophoresis. 1st. edition. Little Brown and Company. Boston. 1969. p. 1-11.
33. Medios de Cultivo. Laboratorios Bioxon de México, S.A.
34. García Manzano, M.A., Valoración de los métodos electroforéticos para lipoproteínas en gel de agarosa y acetato de celulosa. Tesis profesional. Escuela de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, 1976.
35. Isibasi, A. Estudio químico e inmunoquímico de dos polisacáridos bacterianos, extraídos de Salmonella durham salvaje y Salmonella durham convertida por el fago 1, 37, Tesis doctoral. ENCB. México, D.F. 1976.

36. Jay, F.A. Gram negative lipopolysaccharide characterisation of the immunodeterminant structure of lipid A. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy. -- Max Planck Institut für Immunobiologie. Germany 1978.
37. Westphal O. and J. Kann. Bacterial lipopolysaccharide. - Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. En: Methods in Carbohydrate Chemistry. -- Vol.5. General Polysaccharides. Academic Press, N.Y. and London 1965. p. 83-91.
38. Bog-Hansen, T.C., H.H. Krog, and U. Back. 1978. Plasma lipoprotein-associated arylesterase is induced by bacterial lipopolysaccharide. FEBS LETTER 93: 86-90.
39. Skarnes, R.C. 1970. Host defense against bacterial endotoxemia: mechanisms in normal animals. J. Exp. Med. 132: -- 300-317.
40. Isibasi A., E. Jiménez y J. Kumate. 1983. The clearance and tissue distribution of intravenously injected S. typhi polysaccharide in rabbit (artículo en impresión en Infect. Immun.).
41. Skarnes, R.C. 1968. In vivo interaction of endotoxin with a plasma lipoprotein having esterase activity. J. Bact. - 95: 2031-2-34.