



# **OBTENCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN POLISACÁRIDO ZWITTERIÓNICÓ DE SOBRENADANTES DE CULTIVO DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* SEROTIPO 1.**

**JACKELINE CHECA FLORES**

**TESINA DE GRADO**

**LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA**

**FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE LA RÉPÚBLICA**

**MAYO, 2013**

**TUTORA: Dra. Norma Suárez.**

**Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados  
Dep. de Desarrollo Biotecnológico – Facultad de Medicina/Química  
Instituto de Higiene**

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE.....</b>	<b>2</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> : Generalidades.....	6
1.2. Morfología y estructura.....	8
1.3. La cápsula y los polisacáridos capsulares.....	10
1.4. Métodos de observación de la cápsula.....	12
1.5. Biosíntesis de la cápsula.....	12
1.6. Polisacárido capsular de serotipo 1.....	13
1.7. Objetivo general.....	15
1.8. Objetivos específicos.....	15
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
2.1. Materiales.....	16
2.2. Medios de cultivo.....	16
2.3. Cultivo de la bacteria.....	17
2.4. Purificación del CPS 1.....	18
2.4.1. Precipitación alcohólica parcial.....	18
2.4.2. Purificación del CPS 1 por cromatografía de intercambio iónico.....	19
2.5. Métodos químicos y espectroscópicos de análisis del CPS 1.....	19
2.5.1. Determinación de ácidos urónicos.....	19
2.5.2. Determinación de azúcares por técnica de Fenol – Sulfúrico.....	20
2.5.3. Determinación de proteínas solubles.....	20
2.5.4. Técnica de látex.....	20
2.5.5. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR).....	21
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>22</b>
3.1. Determinación de pH en los cultivos de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	24
3.2. Purificación de CPS 1.....	27

3.3. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR).....	28
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>31</b>
<b>5. AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>32</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>33</b>

## **ABREVIATURAS:**

<sup>1</sup>H-NMR: Espectrometría de resonancia magnética de protón

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: Seroalbúmina bovina

CPS: Polisacárido capsular

CPS 1: Polisacárido capsular serotipo 1

DEAE: Dietilaminoetil

Gal: Galactosa

GalNac: N-acetilgalactosamina

Glc: Glucosa

GlcNac: N-acetilglucosamina

MurNAc: Ácido N-acetilmurámico

MS: Medio sintético

NAM: Ácido N-Acetilmurámico

NAG: N-Acetilglucosamina

NMR: Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

PnepNAc: 2-Acetoamido-2,6-didesoxi-L-talosa

PsaA: antígeno de superficie A

Psp: Proteínas de la superficie

*S. pneumoniae: Streptococcus pneumoniae*

Sugp: 2-acetamido-2,6-didesoxi-D- xilohexos-4-ulosa

TSB: Caldo trípico de soja

UndPP: Undecaprenil pirofosfato

Wzy: polimerasa de la vía Wzy dependiente

## RESUMEN

*Streptococcus pneumoniae* es responsable de un número importante de casos de meningitis, neumonía, otitis media y otras enfermedades infecciosas a nivel mundial. La permanente aparición de cepas resistentes a antibióticos constituye un factor crítico en estas infecciones.

El serotipo 1 de *S. pneumoniae* constituye uno de los de mayor incidencia en nuestro país. Las células de *S. pneumoniae* se hallan rodeadas de una gruesa cápsula polisacáridica, que representa el principal determinante antigénico.

Es posible lograr el desarrollo de inmunidad por vacunación con estos polisacáridos por lo que es de vital importancia que los mismos sean producidos en medios de cultivo definidos que permitan disminuir la complejidad de los procesos de aislamiento y purificación de los antígenos.

En esta tesis se abordó en primer lugar el crecimiento de una cepa de *S. pneumoniae* (serotipo 1), en un medio sintético desarrollado en el laboratorio, comparado con el crecimiento del microorganismo en un medio complejo de uso comercial. Se logró la utilización de un medio químicamente definido mejorando los rendimientos de producción de CPS 1 comparado con un medio de cultivo tradicional.

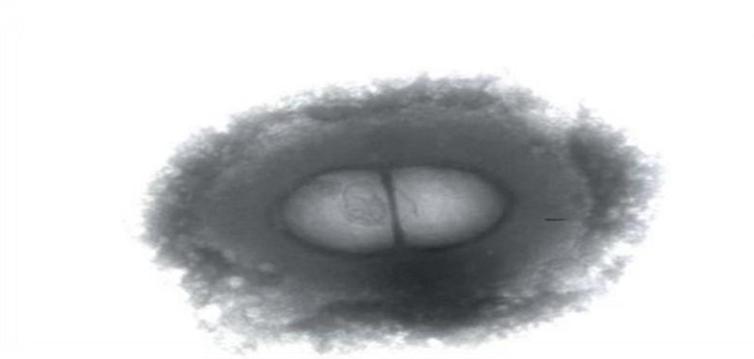
En una segunda etapa, se trabajó en la purificación del polisacárido capsular (CPS 1) mediante Cromatografía de Intercambio Iónico. Se logró purificar y caracterizar en forma preliminar el polisacárido capsular (CPS1) mediante técnicas químicas, bioquímicas y espectroscópicas.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1 *S. pneumoniae*: Generalidades

*Streptococcus pneumoniae* (neumococo) es una bacteria Gram-positiva, microaerófila, que forma parte de la población microbiana que coloniza la nasofaringe. Esta bacteria puede evadir el sistema inmune a través de una combinación de factores de virulencia tanto secretados como expresados en superficie que le permiten provocar infecciones invasivas como neumonía y meningitis o localizadas en las mucosas como otitis media y sinusitis. La neumonía representa el 19% de todas las muertes en niños menores de 5 años, siendo el neumococo la principal causa. Las poblaciones más susceptibles de padecer enfermedad neumocócica son los niños menores de 5 años, los ancianos e individuos inmunocomprometidos.

*S. pneumoniae* es una bacteria Gram positiva encapsulada ovoide, de longitud 0.2 a 0.7  $\mu\text{m}$ ,  $\alpha$ -hemolítica, pertenece a la familia streptococcaceae, género streptococcus, especie *S. pneumoniae*. Microscópicamente son diplococos lanceolados, frecuentemente agrupados en cadenas cortas. Macroscópicamente se presentan en colonias circulares brillantes  $\alpha$ -hemolíticas. Las cepas virulentas de la bacteria producen una gruesa cápsula polisacáridica que constituye el principal determinante antigénico (**Figura. 1**).



**Figura 1:** Micrografía de *Streptococcus pneumoniae*.

Los adultos y niños mayores de 5 años son capaces de desarrollar inmunidad contra estos antígenos, ya sea por una infección previa, o por vacunación. La inmunidad desarrollada de esta forma confiere protección contra infecciones posteriores (Koskela, 1987). A pesar que se considera que *S. pneumoniae* era rutinariamente susceptible a la penicilina y otros agentes

antimicrobianos, la aparición de cepas resistentes y multiresistentes en todo el mundo, ha dificultado el tratamiento de enfermedades en las cuales esta bacteria es el agente etiológico (Klungman, 1990; Breiman, 1994; Hortal, 2001)

La cápsula de *S.pneumoniae* además de actuar como antígeno y poseer propiedades antifagocíticas, permite su clasificación en un gran número de diferentes tipos inmunológicos que se diferencian por sus polisacáridos capsulares. Se han identificado alrededor de 90 diferentes serotipos, los que se designan según el orden en que han sido descritos del 1 al 90, según el sistema americano (Henrichsen, 1995) y de acuerdo a sus similitudes antigénicas, según el sistema danés (Lund, 1963).

Esta gran cantidad de serotipos constituye uno de los escollos principales en el desarrollo de una vacuna efectiva contra *S. pneumoniae*. Sin embargo, para una región determinada, es posible diseñar vacunas dirigidas únicamente contra los serotipos prevalentes y lograr una cobertura amplia y efectiva en un alto porcentaje de casos (OPS, 1992). Así los serotipos de *S. pneumoniae* que revisten mayor interés para el desarrollo de una vacuna para Hispanoamérica y el Caribe son los tipos 1, 5, 6B, 14, 19A y 23F, que representan más del 70% de los serotipos prevalentes en niños menores de 5 años (OPS, 1992).

En Uruguay, la incidencia de neumococcias sistémicas en niños menores de 5 años entre 1994 y 1996 producidas por cepas resistentes a la penicilina aumentó del 29% al 40% y los 7 serotipos predominantes son 14, 5, 1, 6B, 3, 7F y 19A en ese orden. (Hortal 1997, 2001).

La patogenicidad de este microorganismo está dada por un conjunto de factores presentes en el neumococo entero, con participación al inicio de la infección neumocócica, que impiden principalmente la fagocitosis vía inhibición de la activación del complemento y proteínas localizadas en la pared celular (PspA y proteína de unión al factor H) (Jedrzejewski *et al.*, 1993). El polisacárido capsular (CPS) constituye la capa más externa de la célula bacteriana y su principal factor de virulencia ya que confiere protección contra la respuesta inmune.

Por otro lado existen los factores que actúan en la desintegración y la lisis del neumococo (autolisina) activando el complemento y potenciando la inflamación (peptidoglicano, polisacárido de la pared celular y pneumolisina) (Mitchell *et al.*, 1991; Briles *et al.*, 1998).

*S. pneumoniae* infecta exclusivamente al hombre, siendo la nasofaringe su nicho ecológico ya que no existe otro reservorio en la naturaleza. La vía de transmisión del neumococo es aérea, a través de gotitas de saliva de portadores o de enfermos. Es un organismo sensible al calor, al frío y a la desecación, por lo tanto la transmisión requiere de un contacto estrecho de persona a persona (Moxon *et al.*, 1986).

## 1.2 Morfología y Estructura

La estructura básica de la pared celular está formada por una o varias capas de peptidoglicano, situadas alrededor de la membrana plasmática a la cual se le unen los polisacáridos de la pared (PSP), proteínas y el polisacárido capsular (CPS). Los peptidoglicanos están compuestos por disacáridos, unidades alternantes y repetitivas de N-acetil-glucosamina y ácido N-acetilmurámico, unidas por enlaces N-glucosídico  $\beta$ -1,4 (Beveridge *et al.*, 1981)

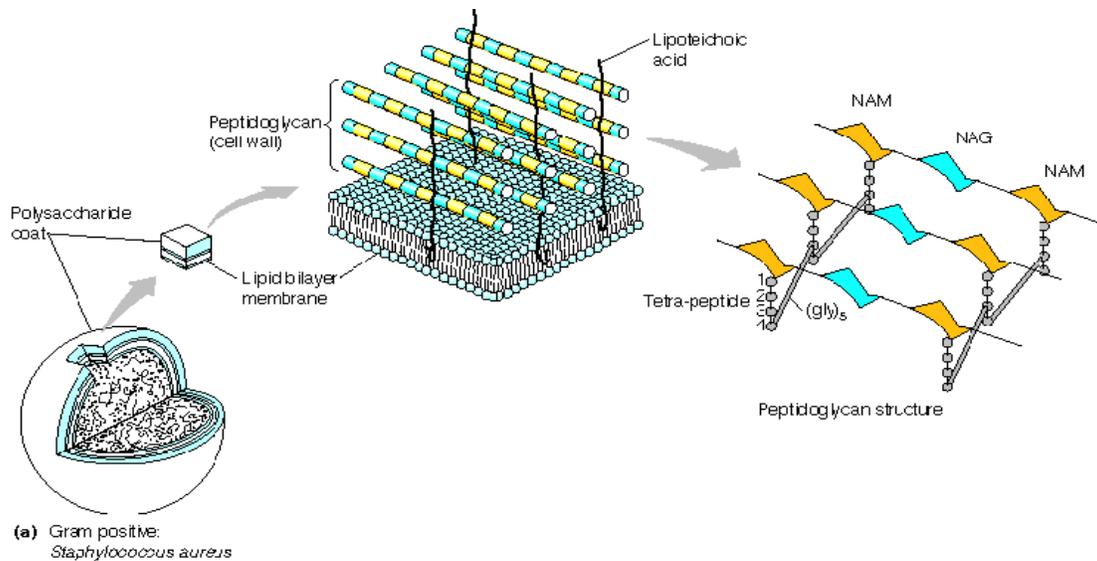
Existen dos etapas en la biosíntesis del peptidoglicano, la primera consiste en el ensamblaje de la unidad disacárido-péptido vía una serie de precursores UDP o intermediarios lipídicos que da lugar a la formación del intermediario lipídico final el cual lleva la unidad disacárido péptido completa y es transferida por un mecanismo hasta hoy desconocido a través del medio hidrofóbico de la membrana hacia los sitios localizados externamente para la incorporación de la unidad biosintética en el peptidoglicano creciente. La segunda etapa de la síntesis del peptidoglicano consiste en la polimerización de ésta unidad en la superficie externa de la membrana citoplasmática y la unión del nuevo material con la pared celular preexistente. Existen dos tipos principales de actividades enzimáticas unidas a la membrana que están involucradas en la biosíntesis: las glicosiltransferasas (Heinjenoort 2001) que catalizan la formación de las cadenas lineales de glicanos y las transpeptidasas que catalizan la formación de los puentes peptídicos. Las cadenas de glucanos formadas por los carbohidratos están entrecruzadas por péptidos formando una malla tridimensional (**Figura 2**) (García Bustos *et al.*, 1987).

Los enlaces glucosídicos que conectan los carbohidratos en las cadenas de glicanos son muy fuertes, pero estas cadenas por sí mismas no podrían proporcionar rigidez en todas las direcciones. La resistencia total de la estructura de los peptidoglicanos se obtiene cuando las cadenas se unen por medio de los enlaces peptídicos cruzados. Estos entrecruzamientos se presentan de manera característica y son específicos tanto del serotipo como del género bacteriano y la pared posee mayor rigidez cuanto más completo sea este entrecruzamiento.

A diferencia de las bacterias Gram-negativas, las Gram-positivas no tienen definido claramente un espacio periplásmico. Sin embargo, numerosas moléculas están asociadas con la capa de peptidoglicano, creando adyacente a la pared celular de estos microorganismos un espacio periplásmico integrado (Beveridge, 1995). Existen numerosas (macro) moléculas covalentemente unidas al peptidoglicano y otras (macro) moléculas que sobresalen a través del mismo. Ejemplos de estos son los ácidos teicoicos o polisacáridos de la pared (PSP) y la cápsula, los cuales están directamente unidos al peptidoglicano (Tomasz, 1981; Sorensen *et al.*, 1990).

Los ácidos teicoicos se localizan a lo largo de la pared celular y aquellos que se encuentran anclados a los lípidos de la membrana plasmática por uniones covalentes, dan lugar a la formación de ácidos lipoteicoicos, que protruyen a través de la pared celular. Los neumococos poseen además proteínas unidas a residuos de colina asociados a las estructuras de los ácidos (lipo)teicoicos; las mismas utilizan un dominio de unión a colina, para unirse a las células bacterianas. Los ácidos (lipo)teicoicos en su conjunto forman una gran extensión de polisacáridos cargados negativamente unidos a la membrana plasmática de la bacteria por enlaces covalentes (Tortora., *et al.* 2007). Finalmente también hay proteínas unidas directamente a la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática.

Todos estos componentes forman una estructura multilaminar, como un “exoesqueleto”, entrelazándose entre sí, proporcionando rigidez y soporte estructural (**Figura 2**).



**Figura 2: Estructura de la pared celular bacteriana.** Adaptado de Mathews, Van Hold and Ahern 2002. NAM: ácido N-Acetil murámico, NAG: N-acetilglucosamina.

### 1.3 La cápsula y los polisacáridos capsulares

La cápsula constituye una estructura superficial compuesta por un polímero de alto peso molecular (CPS), de aspecto viscoso conformado por unidades repetitivas de oligosacáridos, que se extiende aproximadamente de 200 a 400 nm desde la pared celular (Alonso *et al.*, 1995).

El CPS está conectado al neumococo mediante una unión covalente al peptidoglicano de la pared celular, con excepción del serotipo 3, donde la cápsula no se encuentra unida a la pared celular sino anclada a la membrana celular mediante un residuo de fosfatidilglicerol (Cartee *et al.*, 2005)

La virulencia y la invasividad del neumococo varían de acuerdo con los serotipos y dependen de la composición química y de la cantidad de CPS producido. Esto está relacionado con la supervivencia bacteriana y la capacidad de producir enfermedad invasiva. Las cepas encapsuladas son  $10^5$  veces más virulentas que las no encapsuladas. (Watson *et al.*, 1990). El polisacárido capsular (CPS) fue descrito como el primer antígeno no proteico, inductor de anticuerpos en humanos (Jones, 2005) y se encuentra en forma soluble en los líquidos corporales de los pacientes infectados y en cantidades importantes actúa neutralizando los anticuerpos anticapsulares haciéndolos inaccesibles a los gérmenes invasores.

La mayoría de los neumococos presentan un mecanismo denominado variación de fase, según el cual la bacteria expresa más o menos material capsular, situación que se puede demostrar fácilmente por la morfología opaca de las colonias en cultivos en medios sólidos. Mediante este cambio el microorganismo se adapta al medio en las distintas etapas de la infección (Weiser *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1998). Varias cápsulas son altamente polares e hidrofílicas, e interfieren en la interacción del fagocito con la bacteria. La ingestión y destrucción de la bacteria por los fagocitos del hospedero, requiere que el microorganismo esté cubierto por anticuerpos o complemento para la opsonización.

Los estudios de la estructura química de este antígeno revelan que la mayoría de los tipos poseen una cápsula cargada negativamente (excepto los serotipos 7 y 14 que son neutros) y poseen componentes ácidos como el ácido glucurónico (en los tipos 1, 2, 3, 5, 8, 9A y 9V) o fosfato en enlaces fosfodiéster (en los tipos 6A, 6B, 11A, 15F, 19F, 19A y 23F). En la **Figura 3** se muestra las estructuras de las unidades repetitivas de las cepas prevalentes en nuestra región.



## 1.4 Métodos de observación de la cápsula

Su observación mediante microscopía óptica es posible mediante un procedimiento denominado tinción negativa, que permite teñir la cápsula contrastándola a la célula y el medio externo.

La tinción se realiza mezclando una suspensión de neumococos con suero de conejo antineumococo, y luego agregando una gota de tinta china, produciéndose un fenómeno de hinchamiento (Quellung) de la cápsula que permite su visualización en contraste con el fondo oscuro de la tinta china.

Se puede también utilizar la microscopía electrónica, para lo cual hay que recurrir a la estabilización previa de la estructura capsular (para evitar su contracción ulterior) por medio de anticuerpos anticapsulares o de lectinas. Tras esta operación, se procede a la tinción por una ferritina catiónica (por. ej. el rojo de rutenio), con afinidad hacia polianiones (Madigan *et al.*, 1997)

## 1.5 Biosíntesis de la cápsula

La cápsula se sintetiza de manera rápida durante la fase logarítmica del crecimiento bacteriano. En *S.pneumoniae*, la biosíntesis y exportación ocurre a través de dos vías conocidas como la vía sintasa y la vía Wzy-dependiente.

La vía sintasa dependiente es la vía más simple pero se ha observado únicamente en los serotipos 3 y 37 (Arrecuebieta *et al.*, 1994, 1995). Consiste en una única proteína integral de membrana, la cual podría ser responsable tanto de la adición de los azúcares como de la extrusión del polímero naciente a través de la membrana celular formando un poro en la membrana a través del cual la cadena polisacáridica puede ir potruyendo a medida que es sintetizada.

La vía Wzy-dependiente ha sido identificada en 88 serotipos de *S. pneumoniae* y los genes correspondientes a esta vía están ubicados en el mismo locus del cromosoma (*cps*), entre los genes *dexB* y *aliA* (Lopez *et al.*, 2004). Los loci son complejos y comprenden desde 10 hasta más de 20 genes, sugiriendo un mecanismo biosintético más elaborado. La región del cromosoma donde está ubicados los genes que codifican las enzimas que participan en la biosíntesis de la cápsula está organizada como cassettes, con regiones de genes que codifican

funciones requeridas para la producción de una estructura capsular específica, limitadas por otras regiones de genes comunes a la cápsulas de todos los serotipos (Arrecubieta, 1994).

Se ha propuesto que el paso inicial de la vía Wzy.dependiente consiste en la transferencia de un residuo de monosacárido y su unión a través de un enlace pirofosfato a un transportador lipídico, el alcohol undecaprenil pirofosfato (UndPP). En los serotipos que contienen glucosa, éste paso es llevado a cabo por una glucosa-1-fosfato transferasa denominada CPsE/WchaA (Kolkman, 1996); estas enzimas se encuentran asociadas a la membrana facilitando la interacción con el lípido transportador. Los monosacáridos componentes de la unidad repetitiva son unidos por distintas transferasas y el oligosacárido translocado a través de la membrana celular por la enzima Wzx flipasa.

En algún punto durante la polimerización la cápsula es unida covalentemente a la pared celular (Sorensen *et al*, 1990) pero no se conoce en detalle cuándo ni cómo ocurre. Algunos autores proponen que un complejo proteico sería el encargado de la translocación del CPS maduro y de su unión a la pared celular, mientras otros proponen la acción de una ligasa. Mecanismos similares ocurren en la síntesis de las cápsulas de otras bacterias streptocóccicas, estafilocóccicas y muchas gram negativas.

## **1.6 Polisacárido capsular del serotipo 1**

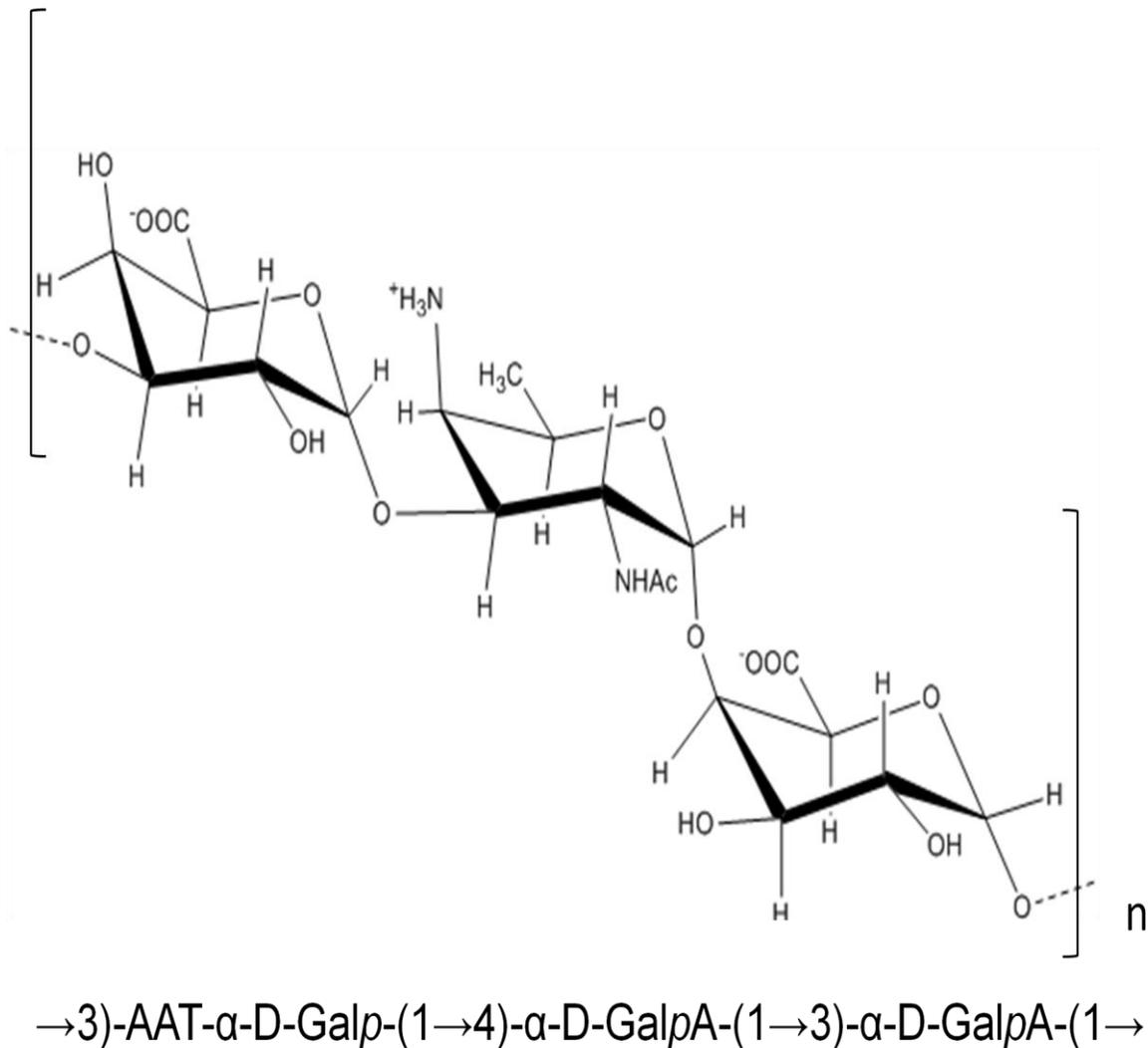
El serotipo 1 de *S.pneumoniae* es uno de los de mayor prevalencia en nuestro país. Si bien se han descrito más 90 serotipos diferentes de *S. pneumoniae*, la experiencia clínica acumulada en nuestra región muestra que son pocos los serotipos con mayor impacto clínico y es así como el serotipo 1, 5 y 14 son responsables del 80% o más de las infecciones neumocóccicas invasivas en nuestra región (Hortal *et al.*, 2001). La distribución geográfica y por grupo etario de estos serotipos también tiene variaciones; se ha observado que el serotipo 1 se encuentra entre los más frecuentes en regiones del mundo con menor desarrollo socioeconómico.

Todas las vacunas existentes contra *S.pneumoniae* incluyen este serotipo cuya cápsula está constituida por un polisacárido formado por unidades repetitivas de 2-Acetamido-2,6-didesoxi-D-xilohexos-4-ulosa y dos residuos de ácido galacturónico. El CPS 1 es un polisacárido de naturaleza zwitteriónica, debido a la presencia simultánea en sus unidades repetitivas de grupos amino que le confieren cargas positivas y de grupos carboxilato o fosfato que le proveen de

cargas negativas a pH fisiológicos. Se ha reportado recientemente que algunos polisacáridos capsulares bacterianos zwitteriónicos pueden ser procesados por el sistema inmune por una vía diferente a la conocida para la mayoría de otros antígenos bacterianos generando una respuesta T-dependiente (Cobb *et al*, 2004,2005).

El laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados cuenta con experiencia en la producción de CPS de *S. pneumoniae* serotipo 14 y ha desarrollado métodos de purificación mediante cromatografía de intercambio iónico, empleando como fase estacionaria DEAE-Sepharose.

La posibilidad de obtener, purificar y caracterizar un polisacárido con las características indicadas y de vital importancia en nuestra región se fijó como objetivo del presente trabajo.



**Figura 4:** Estructura del polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 1.

## **OBJETIVO GENERAL:**

El objetivo general de esta tesis es la obtención del polisacárido capsular serotipo 1 producido por *Streptococcus pneumoniae* en cantidad y pureza adecuadas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1 – Comparación de la producción de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 1 entre dos medios de cultivos, en los cuales se evalúan los rendimientos del proceso de producción y pureza.

2- Obtención y purificación del polisacárido capsular serotipo 1 (CPS1) de *Streptococcus pneumoniae*.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1 Materiales

DEAE Sepharose obtenida de Pharmacia Biotechnology (Uppsala, Sweden). La cepa 2741 Serotipo 1 de *Streptococcus pneumoniae* obtenida de The National Centre for *Streptococcus pneumoniae* (Alberta, Canadá).

Bovin serum albumin (BSA), carbazol fueron obtenidos de Sigma (St.Louis, MO, USA). El kit de reactivos de ácido bicinconínico fue obtenido de Pierce Chemical Company (Rockford, IL, USA). Sangre ovina obtenida del Instituto de Higiene (Facultad Medicina, UDELAR). Agar base, Bioquím Ltda, (Montevideo, Uruguay)

## 2.2 Medios de cultivo

Agar base 15g/l

Sangre ovina 5%

Medio líquido comercial de cultivo: Se utilizó el medio TSB (Caldo Triptico de soya)

Composición (g/L):

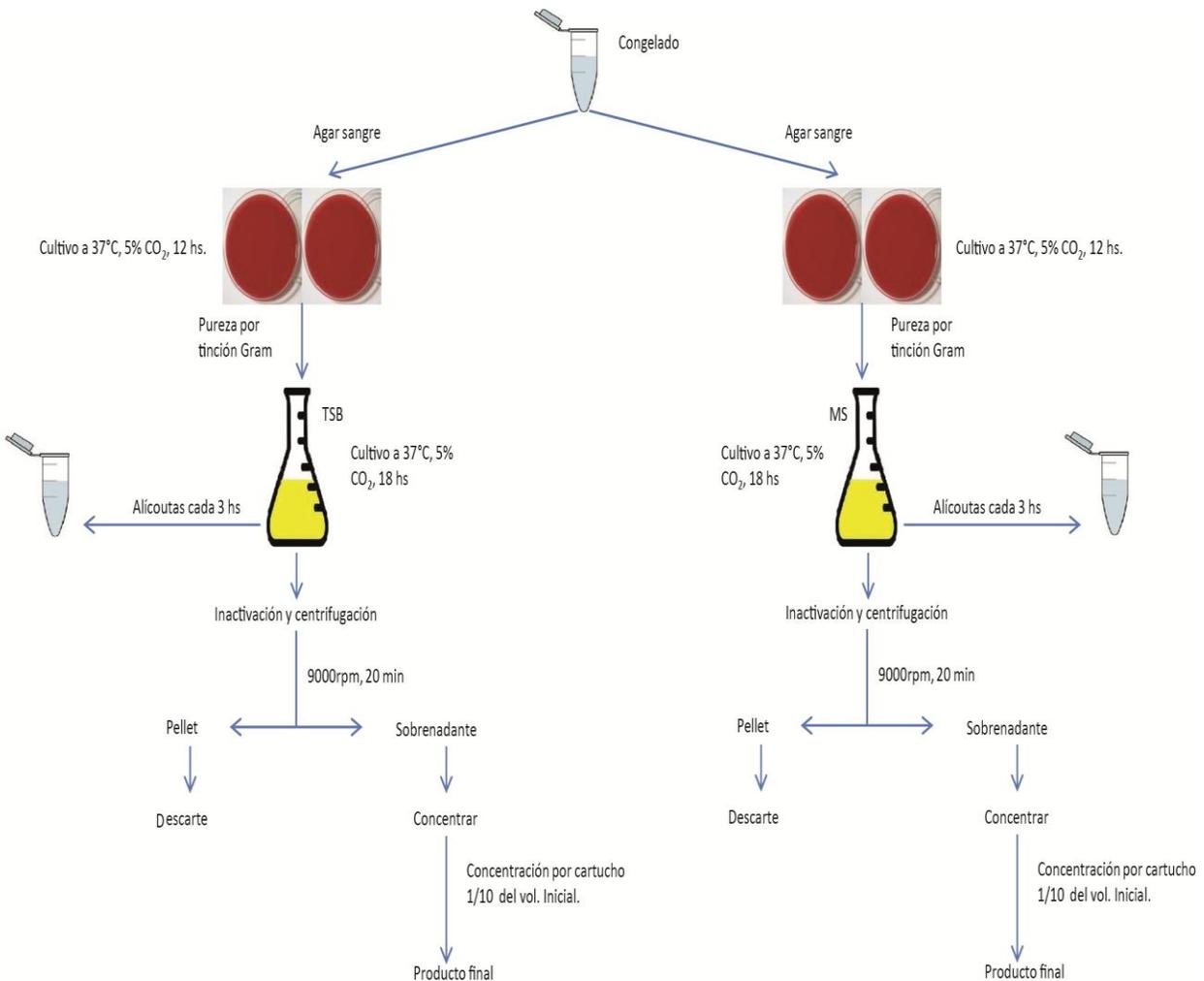
Triptona.....	17.0
Peptona de soya.....	3.0
Cloruro de sodio.....	5.0
Fostato di-potásico.....	2.5
Glucosa.....	2.5

Preparación: Se disolvió 30 g del producto TSB y 5 g de extracto de levadura en 1 L de agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 min.

Medio Sintético Químicamente Definido (MS): Medio desarrollado en el Departamento Biotecnológico del Instituto de Higiene. El mismo está compuesto por fuentes de nitrógeno (amino ácidos), sales, vitaminas, carbohidratos y factores de crecimiento que contemplan las necesidades de un medio para el crecimiento del *Streptococcus pneumoniae*.

## 2.3 Cultivo de la bacteria

La cepa de *S. pneumoniae* congelada se inoculó sobre placas de agar sangre que fueron incubadas a 37° C, en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> durante 18 hs. Una vez comprobada la pureza del cultivo (tinción de Gram), se prepararon cultivos intermedios en los medios de cultivo descritos, durante 4 horas hasta alcanzar una DO de aproximadamente 1.0, con los cuales se sembraron matraces de 1 L incubando hasta 24 horas tomando muestras cada 3 horas (**Esquema 1**).



**Esquema 1.** Diseño experimental para el cultivo de *S. pneumoniae*.

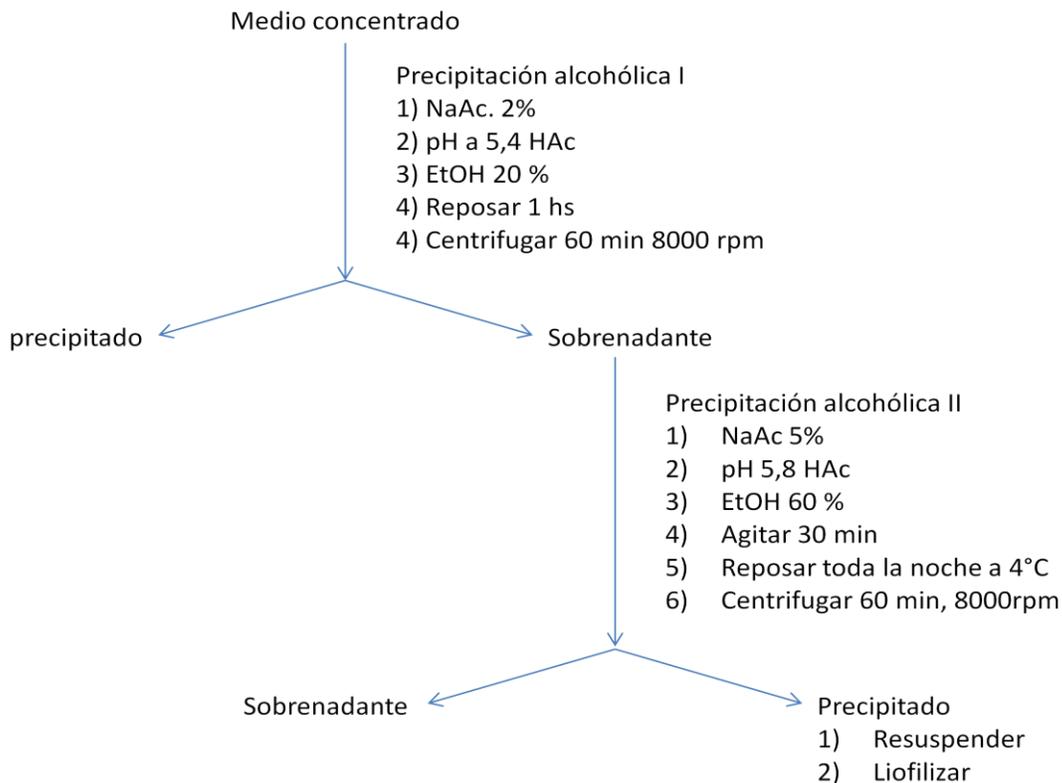
Se determinó la DO a un  $\lambda = 600$  nm. Por definición en la literatura se describe que a un  $\lambda = 600$  nm se utiliza como estándar de trabajo para cultivos microbianos, donde la absorción de luz dada

por componentes como proteínas, ADN, pigmentos y otros es mínima, produciendo menor interferencia al momento de medir la dispersión de la luz en función del crecimiento del cultivo. También se determinaron otros parámetros como el pH, el contenido de glucosa y el título de látex en cada muestra. El pH fue mantenido en 7.2. Finalmente los cultivos fueron inactivados con azida de sodio al 0,1%.

## **2.4 Purificación del CPS 1**

### **2.4.1 Precipitación alcohólica parcial**

Para la obtención del polisacárido capsular, los cultivos inactivados fueron centrifugados a 9000 rpm durante 20 min, el sobrenadante se concentró a un 1/10 de su volumen inicial mediante ultrafiltración por cartucho de fibra hueca y luego se dializó contra agua destilada durante 24 horas. Finalmente se liofilizó para proceder a la etapa de purificación de acuerdo al **Esquema 2**. Brevemente: Se resuspendió el producto liofilizado en agua destilada, se ajustó el pH a 5,4 agregando acetato de sodio hasta 2 % y se agregó etanol hasta una concentración del 20 %. Luego de un reposo a 4°C durante una hora, se centrifugó a 8000 rpm durante una hora y se agregó nuevamente acetato de sodio hasta 5 % ajustando el pH a 5,8 con ácido acético. Se agregó etanol hasta una concentración del 60 %, se agitó media hora, se ajustó el pH entre 6,6 y 6,8 y se dejó reposar durante toda la noche a 4° C. Posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante una hora y el precipitado conteniendo el polisacárido se suspendió en una solución de acetato de sodio 0,3 M pH 6,8.



**Esquema 2.** Precipitaciones alcohólicas para la obtención de CPS 1.

### 2.4.2 Purificación del CPS 1 por Cromatografía de Intercambio Iónico.

El polisacárido impuro obtenido en la etapa anterior, dializado y liofilizado (50 mg) se retoma en 1 ml de buffer fosfato 0.01 pH 8.0 y se aplica a una columna de DEAE Sepharose (25 cm x 2.0 cm) previamente equilibrada en el mismo buffer. La elución del producto se realizó con un gradiente de NaCl de 0 a 1 M y se colectaron fracciones de 7 ml con un total de 28 ml/Hs.

Las fracciones fueron analizadas empleando un reactivo de látex específico y se determinó concentración de proteínas y carbohidratos. Las fracciones positivas en la reacción de látex y de carbohidratos fueron juntadas, dializadas 24 horas contra agua destilada, liofilizadas e intercambiadas por D<sub>2</sub>O para su análisis por <sup>1</sup>H-NMR.

## 2.5 Métodos Químicos y Espectroscópicos de Análisis del CPS 1

### 2.5.1 Determinación de ácidos urónicos

La determinación de ácidos urónicos en los sobrenadantes de cultivo se realizó por el método descrito por Tylor *et al.*, 1992. Brevemente se preparó una solución de borato de sodio 0,9 g en

ácido sulfúrico concentrado (10 ml) a 0° C (A) y otra solución conteniendo 100 mg de carbazol en 100 ml de etanol absoluto (B). Se realizó una curva de calibración con ácido glucurónico. Se incubaron 250 µl de las muestras con 1.5 ml del reactivo A, calentando a 100° C durante 10 minutos, se dejó enfriar y se agregó 50 µl del reactivo B, calentando nuevamente a 100° C durante 15 minutos. Se dejó enfriar y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 525 nm contra un blanco.

### **2.5.2 Determinación de Azúcares por la técnica de Fenol-Sulfúrico**

#### **Análisis cualitativo**

Se toman alícuotas de 10 µl a cada fracción purificada por cromatografía de intercambio iónico, se agregan 250 µl de una solución de fenol 0,5%(p/v), se agita durante 1 minuto y se agregan 750 µl de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente se calienta la muestra en tubo cerrado a 120° C en un baño de aceite. La presencia de carbohidratos se observa por el desarrollo de color naranja, comparando con una muestra control (Cuesta *et al.*, 2003)

### **2.5.3 Determinación de proteína soluble**

Se realizó mediante una modificación del método del ácido bicinconónico (BCA) descrito por Smith *et al.*, 1987. Brevemente se realizó una curva de calibración con BSA. Se incubaron alícuotas de 50 µl de la muestra con 200 µl de reactivo BCA durante 30 minutos a 37° C. Se leyó la absorbancia a  $\lambda$  560 nm.

### **2.5.4 Técnica de Látex**

El contenido de CPS1 en la muestra a analizar se determinó en forma semi-cuantitativa mediante el empleo de un reactivo látex policlonal específico (Battistoni *et al.*, 1998). Para ello, se mezcló en una placa para test de látex 40 µl de diluyente (PBS-BSA 0.1%) y 40 µl de la muestra a analizar realizándose a partir de ésta diluciones seriadas al medio. A cada pocillo se le agregaron 30 µl de látex, se mezcló y agitó con agitación orbital (100 rpm) durante 3 minutos. Se detuvo la reacción y se observó bajo lámpara la formación de aglutinación. El título se define como el inverso de la mayor dilución capaz de causar aglutinación visible en las condiciones descritas.

### **2.5.5 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR)**

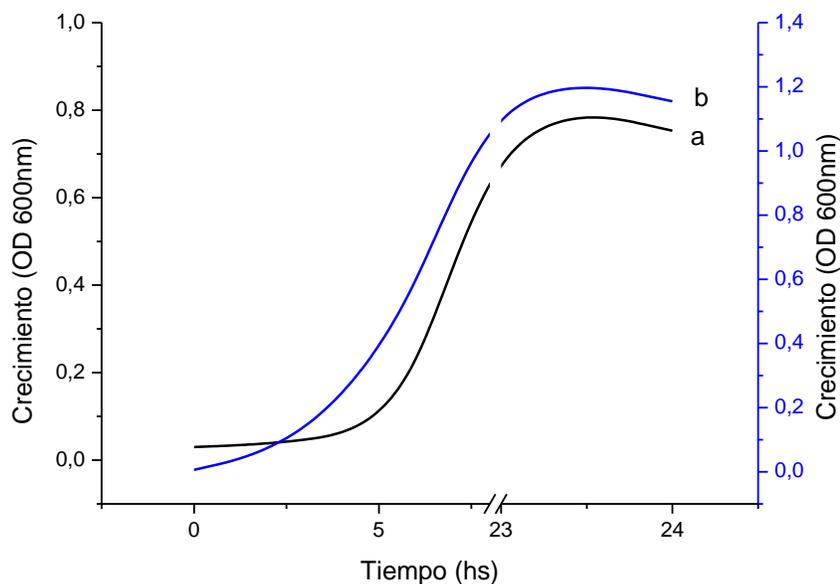
Los espectros de  $^1\text{H}$  NMR fueron obtenidos a 400 y 100 MHz en un equipo Bruker Avance DPX 400. Los resultados fueron expresados en ppm respecto a TSP ( $\delta_{\text{H}}$  0.00) y acetona ( $\delta_{\text{C}}$  31.00) utilizando  $\text{D}_2\text{O}$  como solvente a  $70^\circ\text{C}$  y  $30^\circ\text{C}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la obtención del CPS 1 se partieron dos medios diferentes TSB y MS, uno comercial y otro químicamente definido diseñado para que cumpla con las exigencias de un medio de cultivo, pero con componentes conocidos, comparado con un medio complejo utilizado rutinariamente para el cultivo del microorganismo.

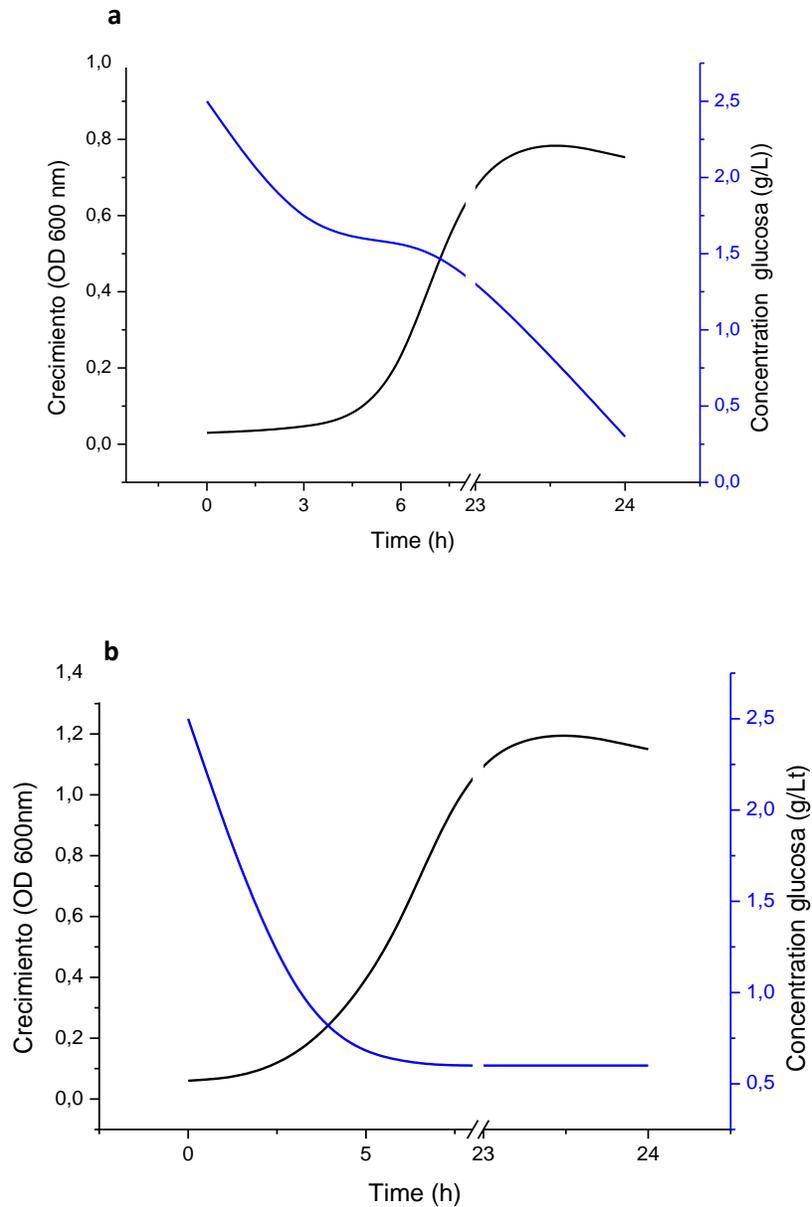
Los resultados que se presentan muestran una diferencia en la cantidad y calidad del producto obtenido.

En la **Figura 5** se observa el resultado de los ensayos de cultivo de *S. pneumoniae* con el medio químicamente definido (MS). Como se puede observar, con el medio sintético desarrollado se obtuvieron valores de DO a  $\lambda = 600 \text{ nm}$  mayores que en los obtenidos en TSB, los cuales son directamente proporcionales al crecimiento bacteriano. Se observó también una reducción de la fase lag, demostrando un gran potencial para optimizar la producción de estos antígenos y optimizar el tiempo de fermentación mediante ciclos más cortos de producción, es decir se obtiene más producto en un menor período de tiempo.



**Figura 5.** Crecimiento de *S. pneumoniae* : a) TSB; b) MS

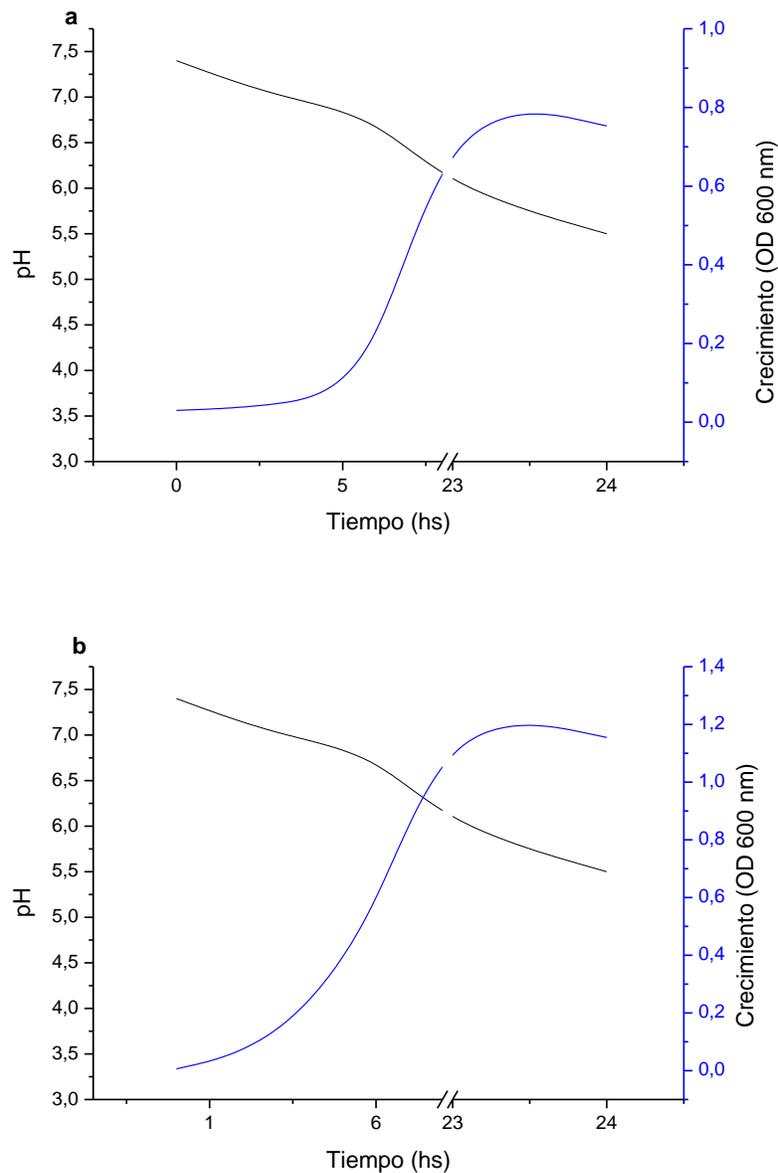
En las **Figura 6 a y b** se puede observar el consumo de glucosa durante el crecimiento de *S. pneumoniae* en ambos cultivos. En la **Figura 6 a** se muestra el crecimiento de *S. pneumoniae* en TSB con una fase lag extendida hasta aproximadamente 5 horas y un consumo de glucosa coincidente con el inicio de la fase logarítmica. Por otro lado en la **Figura 6 b** el consumo de glucosa en el medio MS es inmediata, menor a las 5 horas, y la fase lag más corta, siendo un beneficio para el cultivo de *S. pneumoniae* en el medio de cultivo sintético desarrollado.



**Figura 6.** Crecimiento de *S.pneumoniae* y consumo de glucosa en **a:** TSB; **b:** MS

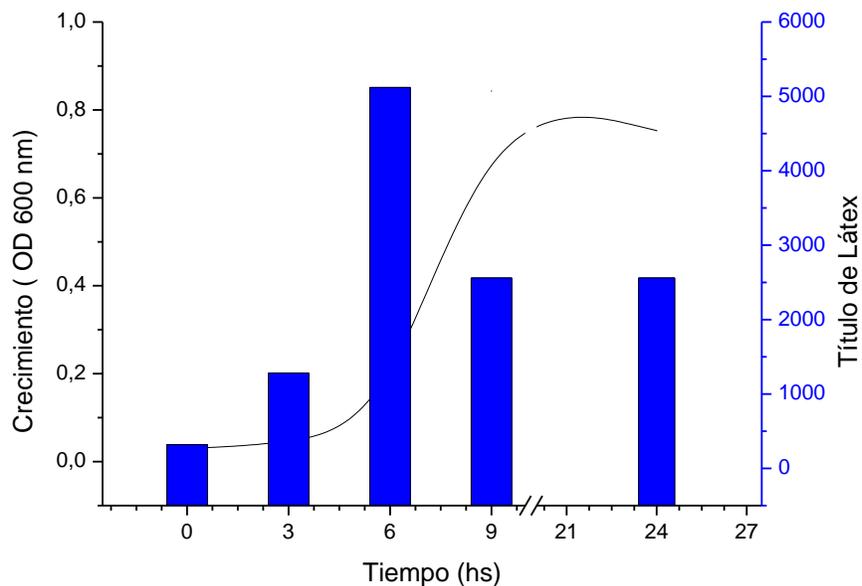
### 3.1 Determinación de pH en los cultivos de *S. pneumoniae*

En la **Figura 7 a y b** se observa el comportamiento del pH en el cultivo de ambos medios. La variación es similar en ambos medios durante el tiempo de cultivo comenzando con un pH de 7.2 hasta su descenso a aproximadamente 5.5 luego de 24 horas, coincidente con la acidificación del cultivo a medida que avanza el crecimiento del microorganismo y coincidente con lo reportado en la literatura respecto a la variación de pH óptimo durante el crecimiento del microorganismo (paper).



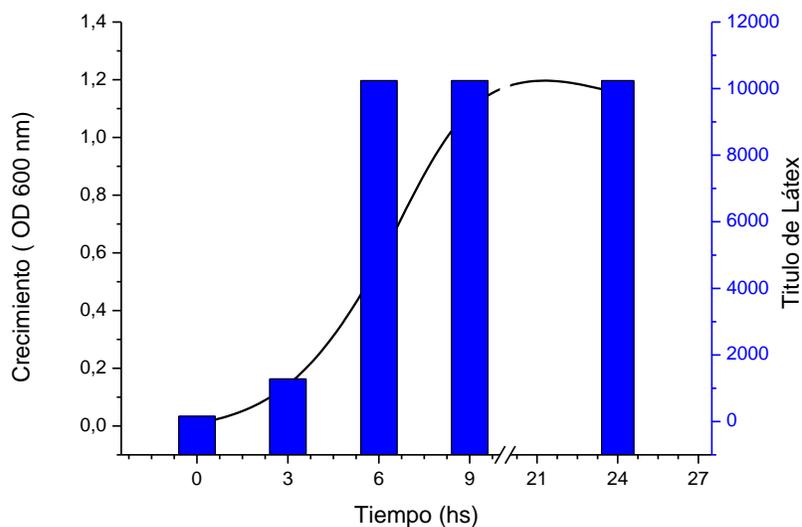
**Figura 7.** pH en el cultivo de *S.pneumoniae*: **a:** TSB; **b:** MS

El contenido de CPS 1 en los medios de cultivo utilizados fue estimado empleando un reactivo de látex específico confirmando así su identidad. En la **Figura 8 a**, se muestra el título de agregación de látex igual a 2500, durante la fase exponencial del crecimiento del microorganismo en TSB. Se tomaron alícuotas cada 3 horas. Se observa un aumento en la fase exponencial del crecimiento que alcanza un máximo a las 6 horas pero que no se mantuvo constante en el tiempo, las diferencias en la reacción de agregación de látex podría deberse a posibles interferencias de los componentes del medio de cultivo con el látex y/o al error inherente del método utilizado.



**Figura 8 a.** Crecimiento de *S.pneumoniae* en TSB y determinación de CPS 1 obtenida por técnica de látex.

Por otro lado en la **Figura 8 b** se muestra el título de látex durante la fase exponencial del crecimiento obtenidas en el medio sintético. En éste caso se pudo observar un aumento de CPS 1 concordante con el aumento de la biomasa (equivalente a número de células), medido a través de la densidad óptica (DO) a  $\lambda = 600$  nm. Además se alcanzó un máximo en la producción de antígeno a las 6 horas, manteniéndose constante hasta las 24 horas de cultivo. Este valor es 4 veces superior comparado con el título obtenido para el medio TSB.



**Figura 8 b.** Crecimiento de *S.pneumoniae* en medio sintético y determinación de CPS 1 obtenida por técnica de látex.

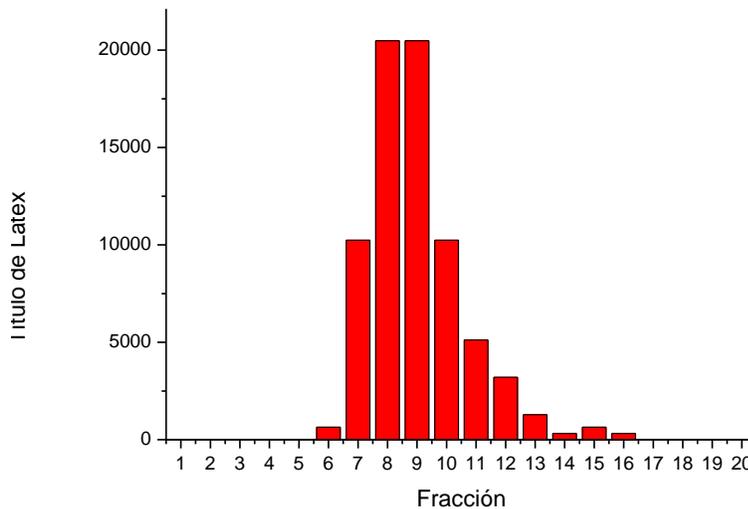
Se determinó contenido de ácidos urónicos y proteínas en las alícuotas colectadas cada 3 horas. Luego de 24 horas los productos obtenidos en TSB y en MS contenían 73  $\mu$ M y 149  $\mu$ M de ácido urónicos respectivamente. Destacando que el contenido de ácidos urónicos en el MS es el doble que en el TSB.

El contenido de proteínas fue de 0.35 mg/ml y 0,2 mg/ml respectivamente, muestra que el cultivo en MS disminuye el contenido de proteínas comparado con el medio TSB, debido al contenido desconocido de los componentes del medio comercial.

Para proseguir con la purificación del polisacárido capsular se optó por continuar trabajando con el producto obtenido en el cultivo en medio sintético, dada la diferencia en biomasa obtenida en medio sintético, la identidad obtenida por título de látex y pureza determinada por contenido de proteínas.

### 3.2 Purificación del CPS1

Para la purificación del CPS 1 se utilizó una columna de intercambio iónico de DEAE-Sepharose mediante elución por gradiente de NaCl de 0 a 1 M. La concentración de carbohidratos en cada fracción fue determinada de forma cualitativa mediante la técnica de fenol-sulfúrico en cada fracción colectada del gradiente. Esto confirmó la presencia de carbohidratos en el material eluído mediante el gradiente de NaCl correspondiente a la concentración 0,5 M, lo cual indica que dichos carbohidratos poseen carga negativa en las condiciones de análisis. Al analizar las fracciones conteniendo carbohidratos mediante el reactivo de látex específico para el CPS 1 se encontró que algunas fracciones presentaban altos títulos (**Figura 9**). Se observó también que las fracciones positivas para contenido de carbohidratos y reactivo de látex no presentaron una cantidad significativa de proteínas (0,08 mg/ml). Este resultado sugiere que las proteínas fueron removidas mayoritariamente en las etapas previas de purificación, durante las precipitaciones alcohólicas parciales y/o que las proteínas eluyen al final del gradiente.

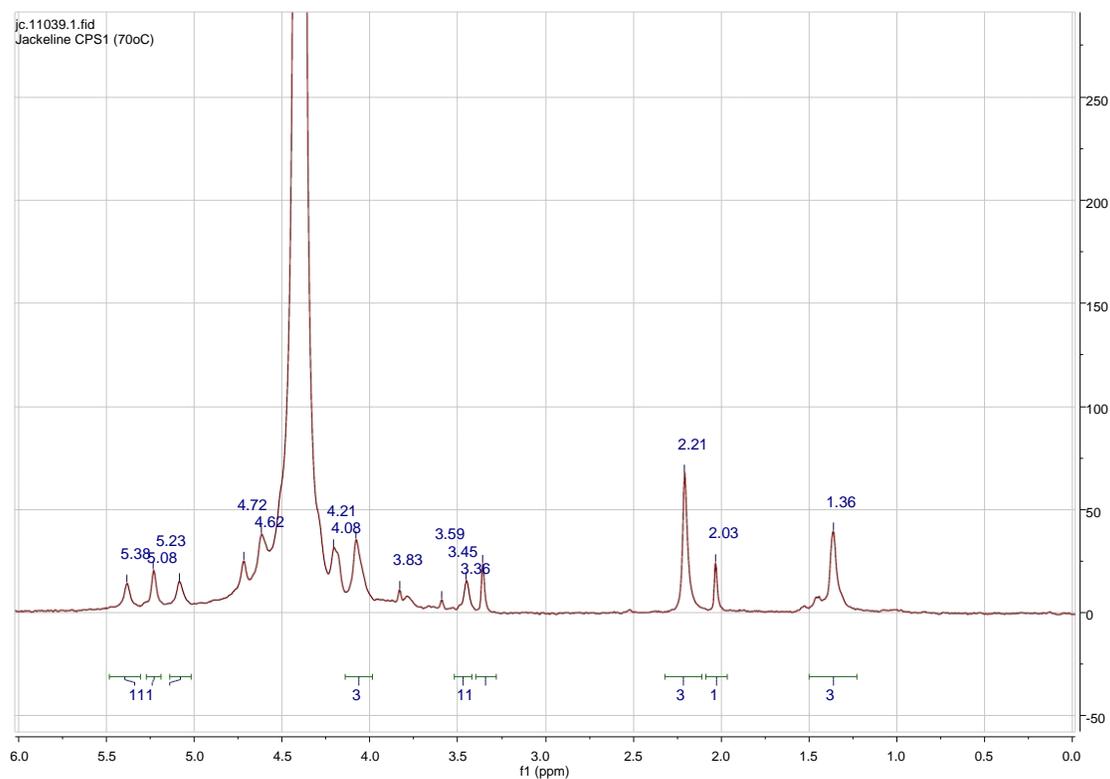


**Figura 9.** Concentración de CPS 1 obtenida mediante un reactivo de látex específico para CPS 1 en las fracciones de cromatografía de intercambio iónico eluídas con gradiente de NaCl.

### 3.3 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los productos obtenidos fueron analizados mediante NMR. En la **Figura 10 a** se observa el espectro de  $^1\text{H}$ -NMR del CPS1 crecido en medio sintético y purificado por cromatografía de intercambio iónico.

La espectroscopia de Resonancia Magnético Nuclear es una técnica valiosa para la caracterización de la estructura química de complejos polisacáridos bacterianos y para la confirmación de su identidad. La estructura química de éstos polisacáridos y el alto peso molecular conducen a espectros variables de NMR, en particular el polisacárido de *S.pneumoniae* serotipo 1 nativo, muestra un espectro que no se resuelve bien, con picos amplios que complican el uso de la técnica para su caracterización estructural (Corné *et al.*, 2002). Generalmente el uso de temperaturas elevadas ( $70^\circ\text{C}$  u  $80^\circ\text{C}$ ) mejora notablemente la resolución de los picos de estos polisacáridos proporcionando una mejora en los espectros que se obtienen pero no siempre es así y a veces es necesario realizar modificaciones químicas en la molécula que produzca cambios significativos en el espectro que se obtiene.

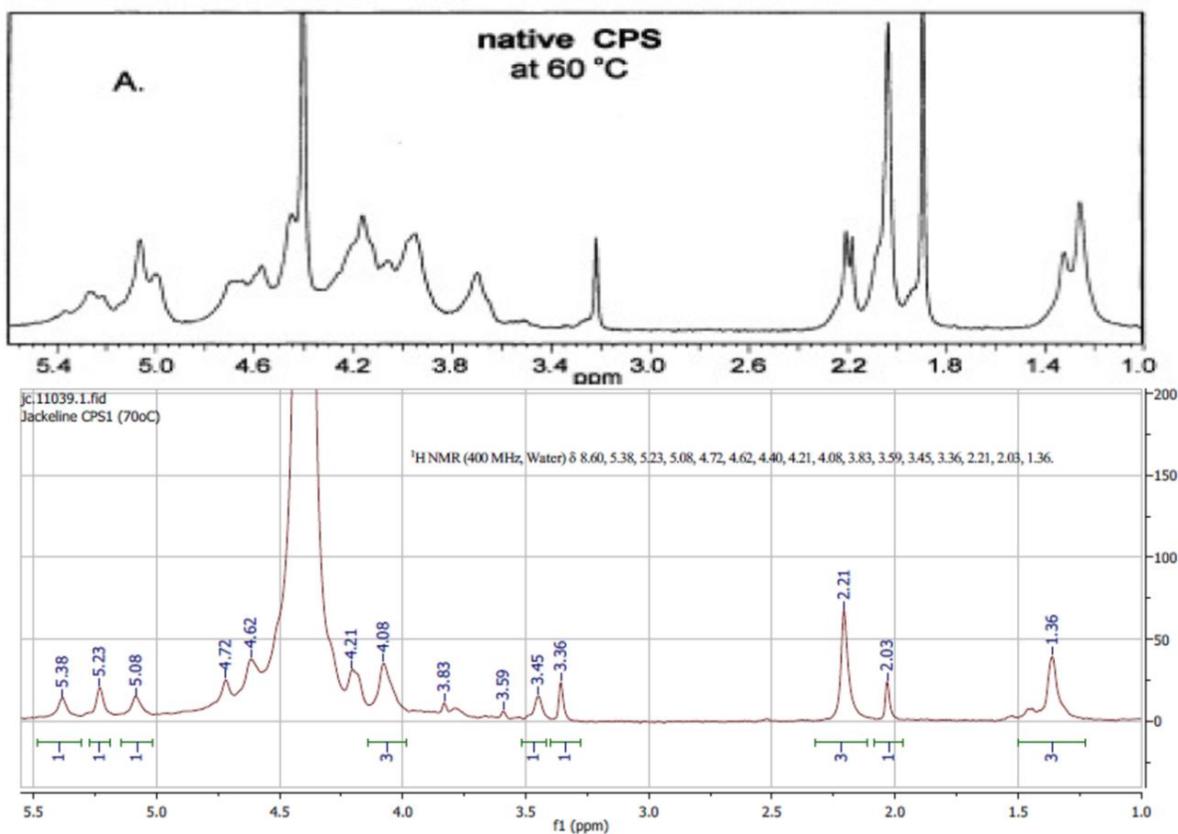


**Figura 10 a**  $^1\text{H}$ -NMR del CPS 1

De acuerdo con la literatura el polisacárido CPS1 está compuesto por una unidad repetitiva trisacáridica de 2-Acetamido-2,6-didesoxi-D-xilohexos-4-ulosa y dos residuos de ácido galacturónico.

Las señales reportadas correspondientes a los protones anoméricos se encuentran en  $\delta$  5,92,  $\delta$  5.04 y  $\delta$  5.15 (Linberg *et al.*, 1979). La mayoría de las señales presentes en el espectro obtenido parecen coincidir en el desplazamiento químico e integración. Las señales donde no coinciden las multiplicidades por ejemplo en el pico a  $\delta$  2.21 que debería ser un doblete y se ve un singlete puede deberse a la poca cantidad de muestra que se encuentra.

Por otro lado en la **Figura 10 b** se compara el espectro de CPS 1 obtenido con el reportado en la literatura (Corné *et al.*, 2002).

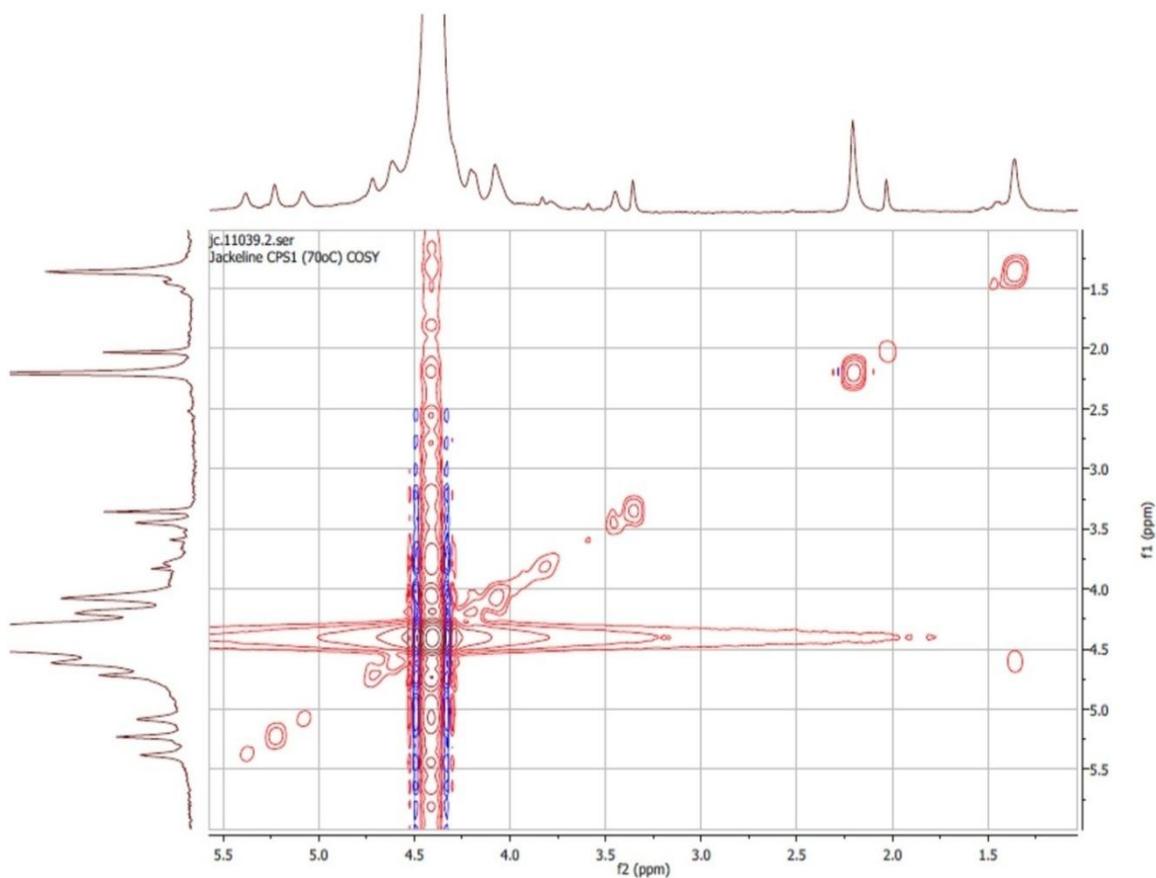


**Figura 10 b** <sup>1</sup>H-NMR del CPS 1nativo a 60° C comparado con CPS 1 nativo a 70 °C

El espectro de CPS 1 nativo reportado por los autores muestra picos amplios y no totalmente resueltos, mientras que el producto obtenido en este trabajo posee picos mejor resueltos con

desplazamientos químicos similares si bien no exactamente coincidentes, lo que podría explicarse por las diferentes temperaturas utilizadas 60° C y 70° C respectivamente, concordante con la literatura. Otras señales diagnóstico presentes son las de los grupos metilo entre 1.3 y 2.2 ppm, de acuerdo a lo reportado por Corné y colaboradores.

El espectro bidimensional **Figura 10 c**, aportó muy poca información, debido a la poca cantidad de polisacárido obtenido. El alto peso molecular del polisacárido podría ser un impedimento para el análisis del mismo por NMR (Corné *et al.*, 2002), ya que no se realizaron modificaciones químicas sobre el producto que permitan una elucidación estructural completa.



**Figura 10 c** Espectro Bidimensional (Cosy) de CPS 1

## CONCLUSIONES

En las últimas décadas se han utilizado polisacáridos bacterianos para el desarrollo de vacunas que se encuentran disponibles en el mercado y que incluyen un número limitado de polisacáridos correspondientes a los serotipos prevalentes. La producción y obtención de polisacáridos capsulares serotipo específicos bien definidos es esencial para diagnóstico, preparación de vacunas así como en investigación y desarrollo. En particular, en la producción de vacunas se debe realizar con un nivel de calidad que permita la obtención de productos que cumplan con las normas preestablecidas en forma consistente en todas las etapas, garantizando la eficacia e inocuidad del producto final.

En el presente trabajo se reportan resultados positivos para el cultivo de *S.pneumoniae* serotipo 1 y producción de antígeno capsular en un medio químicamente definido (MS), el cual fue evaluado frente a un medio de cultivo de uso comercial como el TSB. Se reporta el comportamiento del crecimiento del *S.pneumoniae* en el tiempo, resaltando un aumento de biomasa celular, una disminución de proteínas denotando la pureza del producto obtenido en el medio químicamente definido. Por otro lado se pudo constatar la presencia del antígeno característico de la cepa a través del contenido de residuos de ácidos urónicos.

Los resultados indican que el método de producción propuesto es una forma eficiente de producción de éste antígeno en condiciones controladas.

Se logró aislar, purificar y caracterizar en forma preliminar el polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 1 confirmando su identidad por técnicas inmunoquímicas (látex) y espectroscópicas.

Los resultados obtenidos por Resonancia Magnética Nuclear indican que el polisacárido obtenido posee una estructura similar a la reportada en la bibliografía para el polisacárido capsular de *S. pneumoniae* serotipo 1. Para obtener su caracterización estructural definitiva el polisacárido debe producirse en lotes de mayor volumen, que permitan la obtención de cantidades suficientes para realizar modificaciones químicas que permitan el análisis por NMR y su elucidación estructural completa.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que fueron partícipes directa e indirectamente, desde el inicio hasta final, aportando su granito de arena de distintas formas durante la realización de esta tesina.

Primeramente agradecer a mi tutora de tesis a la Dra. Norma Suárez, por brindarme su apoyo, darme herramientas e impulsarme durante el trayecto de realización del trabajo, transmitiéndome sus conocimientos, guiándome en el desarrollo de la práctica de conocimientos; adquiridos durante la carrera.

Seguidamente agradecer al Dr. Fernando Ferreira por permitirme realizar mi tesis de grado en el Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados.

A la Dra. Esther Texeira por brindarme su tiempo, paciencia, conocimientos, sugerencias y apoyo incondicional y sobre todo por su intervención durante el desarrollo de técnicas microbiológicas.

Al Dr. David González por su invaluable colaboración con Espectrometría de Resonancia Magnética (RMN).

A todos mis compañeros de laboratorio por su colaboración, compañía y apoyo en aquellos días que el trabajo en el laboratorio se extendía a largas jornadas.

Al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA/QUÍMICA).

A mi familia que a la distancia siempre se hizo presente, a mi madre y padre por darme fuerzas e incentivo todos los días.

A mi otra gran familia que forman parte de mi corazón que son aquellos amigos que cultive durante estos de carrera y de la vida, que nunca me abandonaron y siempre me dieron aliento y fuerzas para seguir avanzando.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alonso de Velasco, E., Verheul, A. F., Verhoef, J. & Snippe, J.(1995) Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microb Rev* **59**, 591-603
- Arrecubieta, C., García, E. & López, R. Sequence and transcriptional analysis of a DNA región involved in the production of capsular polysaccharide in Streptococcus pneumoniae type 3 (1995) *Gene* **167**, 1-7
- Arrecubieta, C., López, R & García, E. (1994) Molecular characterization of cap3A, a gene from the operon required for the synthesis of the capsule of Streptococcus pneumoniae type 3: sequencing of mutations responsible for the unencapsulated phenotype and localization of the capsular cluster on the pneumococcal chromosome. *J Bacteriol* **176**, 6375-6383
- Battistoni, J. (1998). Reactivos de Inmunodiagnóstico por aglutinación de partículas de látex. **Tesis de Magister**. Facultad de Química, Montevideo Uruguay.
- Beveridge, T. J. (1981). Ultrastructure, chemistry and function of the bacterial wall. *Int Rev Cytol* **72**, 229-317
- Beveridge, T. J. (1995) The periplasmic space and the periplasm in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *ASM News* **61**, 125-130
- Briles, D., Creech, R., Swiatlo, E., Dillard, J., Smith, P., Benton, K., Ralph, B., Brooks Walter, A., Crain, M., Hollingshead, S. & McDaniel, L. (1998) Pneumococcal Diversity: Considerations for a New Vaccine Strategies with Emphasis on Pneumococcal Surface Protein A (PspA). *Clinical Microbiology Reviews*. 645-657
- Breiman, RF., Butler, JC., Tenover, FC, Elliot, JA & Facklam RR (1994) Emergence of drug-resistant pneumococcal infections in the United States. *J.A.M.A.* **271**: 1831-1835
- Cartee, R. T., Forsee, W. T. & Yother, J. (2005) Initiation and synthesis of the Streptococcus pneumoniae type 3 capsule on a phosphatidylglycerol membrane anchor. *J Bacteriol* **187**, 4470-4479
- Cobb, B.A., Wang, Q.,Tzianabos, A.O., Kasper, D.L. (2004) Polisaccharide Processing and Presentation by the MHCII pathway. *Cell* **117**, 677-687
- Cobb, B.A. & Kasper, D.L. (2005) Zwitterionic capsular polisaccharides: the new MHCII dependent antigens. *Cellular Microbiology* **7** (10), 1398-1403

- Cuesta, G., Bessio, M.I., Suarez, N., Ferreira, F., Massaldi, H., (2003). Quantitative determination of pneumococcal capsular polysaccharide using a modification of the phenol-sulfuric acid method. *J. Microb. Meth* **52**: 69-73
- García-Bustos, J. F., Chait, B. T. & Tomasz, A. (1987) Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. *Glycobiology* **262**, 15400-15405
- García E., García P., López. R (1993) Cloning and sequencing of a gen involved in the synthesis of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Mol. Gen. Genet.* **239**: 188-195
- Heinjenoort, J. (2001) Formation of the glycan chain in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* **11**, 25-36
- Henrichsen, J. (1995) Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol*, **33**: 2759-2762
- Hortal, M., Algorta, G., Bianchi, I., Borthagaray, G., Cestau, I., Camou, T., Castro, M., De Los Santos, M., Diez, R., Dell'Acqua, L., Galiana, A., Giordano, A., Giordano, P., Lopez-Ghemi, G., Milanese, N., Mogdasy, C., Palacio, R., Pedreira, W., Pisano, A. and Pivel, A. (1997) *Microbial Drug Resistance*. **3** 159.
- Hortal M, Camou T. (2001) Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* *Rev Chil Infect*; **18** (supl.1): 22-25
- Jedrzejewski, M. J. (2000) Production and characterization of the functional fragment of pneumococcal surface protein A. *Arch Biochem Biophys* **373**, 116-125
- Jones, C., (2005) NMR assays for carbohydrate –based vaccines. *J. of Pharm and Biochem Anal*, **38**, 840-850
- Kamerling, J.P. Pneumococcal polysaccharides; a chemical view *Streptococcus pneumoniae - Molecular Biology & Mechanisms of Disease* ( A.Tomasz, ed), Mary Ann Liebert, Inc, Larchmont, NY, USA
- Kim, J.O & Weiser, J.N. (1998) Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **177**, 368-377
- Klungman, K.P. (1990) Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin. Microbiol. Rev.*, **3**, 171-196

- Kolkman, M.A., Morrison, D.A. Van Der Zeijst, B. A and Nuijten, P. J. (1996). The capsule polysaccharide synthesis locus of streptococcus pneumonia serotype 14: Identification of the glycosyl transferase gene cps14E. *J.Bacteriol* 178, 3736-3741
- Koskela, M. (1987) Serum antibodies to pneumococcal C polysaccharide in children response to acute pneumococcal otitis media or to vaccination. *Pediatr. Infect. Dis. J*, **6**, 519-526
- López, R. & Gracia, E. (2004) Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes and bacteriophage. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 553-580
- Linberg, B., Lindqvist, B., Lonngren, J. & Powell, D. A. (1980) Structural studies of the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* TYPE 1 *Carbohydrate Research* **78**,111-117
- Lund, E. and Henrichsen, J. (1978) Laboratory Diagnosis, Serology and Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. Chapter XI in “*Methods in Microbiology*”, **Vol. 12**. Academic Press, New York
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. ( 1977) In *Brock Biología de los microorganismos Cap 23933* ( Prentice Hall International, UK)
- Mitchell, T. J., Mendez, F., Paton, J. C., Andrew, P. W., Boulnois, G. J. (1990) Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 and 2. *Nucl. Acid Res*, **18**: 4010
- Moxon, E. (1986) Some aspects of carrier state. *Chemother* **18**: SA: 17-24
- Organización Panamericana de la Salud. (1992) Master Plan: Development of a conjugated vaccine against *Streptococcus pneumoniae*. Washington, D.C
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem*, **150**: 76-85
- Stroop, C. J. M., Xu, Q., Retzlaff ,M., Abeygunawardana, Ch., Bush, C. A. (2002) Structural analysis and chemical depolymerization of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 1. *Carbohydrate Research*. **337**, 335-344.
- Sörensen, U. B., J. Henrichsen, H. C. Chen, and S. C. Szu. (1990). Covalent linkage between the capsular polysaccharide and the cell wall peptidoglycan of *Streptococcus pneumoniae* revealed by immunochemical methods. *Microb. Pathog.* **8**:325-334.

- Tomasz, A (1981) Surface components of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Infect Dis* **3**, 190-211
- Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología*, Cap. 4: 85-89.(Ed. Medica Panamericana S.A., ES)
- Tylor, K., & Buchanan-Smith, J. C. (1992) A Colorimetric Method for the Quantitation of Uronic Acids and a Specific Assay for Galacturonic Acid. *Anal Biochem.* **201**, 190-196
- Watson, D. A., and Musher, D. M. (1990) Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. *Infect. Immun.* **58**: 3135-3138
- Weiser, J.N., Austrian, R., Sreenivasan, P.K & Masure, H. R. (1994) Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* **62**, 2582-2589