

# CIENT-R

YODACION DEL COMPLEJO PROTEICO VA-MENGOC-BC

RADIOIDINATION OF THE PROTEIN COMPLEX OF THE  
VA-MENGOC-BC VACCINE

Caso, R. \*; Lastre, M. \*\*; Alvarez, L. \*\*\*

- \* Centro de Isotopos. La Habana, Cuba
- \*\* Instituto Finlay. Centro de Investigacion  
Produccion de Vacunas y Sueros. La Habana,  
Cuba
- \*\*\* Instituto Superior de Ciencia y Tecnologias  
Nucleares. La Habana, Cuba.

La Habana, Cuba

1996

VOL. 27 No. 23

**YODACION DEL COMPLEJO PROTEICO VA-MENGOC-BC.**

**RADIOIODINATION OF THE PROTEIN COMPLEX OF THE  
VA-MENGOC-BC VACCINE.**

R. Casó(I), M. Lastre(II), L. Alvarez(III)

(I). Centro de Isótopos. (II) Instituto Finlay. (III). Instituto Superior de Ciencias y  
Tecnología Nuclear.

**La Habana, Cuba**

Subject Categories: B 13.30

Key words: iodination: Q1; radiochromatography; iodine 125: M1; quality control; labelling.

## RESUMEN

Se realizó el marcaje con I-125 de las proteínas de la vacuna VA-MENGOC-BC disueltas y conjugadas con polisacáridos del grupo C con el objetivo de su utilización posterior en estudios de la respuesta inmune de la vacuna. Se emplearon tres metodologías de yodación directa: Cloramina-T, Lactoperoxidasa y Yodogén.

Se determinó que con una actividad de 0.1mCi de NaI-125 y utilizando las tres metodologías pueden ser marcadas las proteínas disueltas de la vacuna y sólo dos de ellas (Cloramina-T y Yodogén) pueden ser utilizadas para el marcaje de las proteínas conjugadas de VA-MENGOC-BC.

## ABSTRACT

In this work was made the labelling of the protein complex of the vaccine VA-MENGOC-BC with I-125 in order to study its immunological responses. These proteins were in both forms: dissolved and conjugated with polisacarids of the C group. There were used three methods of iodination: chloramine-T, iodogen and lactoperoxidase.

Was found out that dissolved proteins can be iodinated using these three methods with 0.1mCi of I-125, and the obtained specific activities were similar. Although the conjugated proteins can be iodinated only by two methods (chloramine-T and iodogen), the obtained specific activities were the same.

## INTRODUCCION

La meningitis meningocócica es una enfermedad epidémica, con una notable incidencia mundial en los últimos años [1,2]. El agente causal que más se ha aislado en estos casos es la *Neisseria meningitidis* [3]. Esta patología se presenta en todo el mundo y se manifiesta en forma endémica o epidémica, presentando diferencias en cuanto a la dinámica poblacional de una región a otra, incluso entre diferentes localidades de un mismo país.

Los antecedentes de la enfermedad en Cuba se remontan al año 1916 [2]. En 1948 se reportaron 340 casos de meningitis purulenta [4] correspondiendo 4 al serogrupo C y un caso al B, los mismos grupos responsables de los brotes epidémicos que aparecieron 30 años después. A partir de 1968 comienza a disminuir la tasa de incidencia de la enfermedad en Cuba, la cual fue de 8.5 por cien mil habitantes. En 1969 bajó a 6.5 y ya en 1990 se reportó un valor de 4.3. Los datos demuestran el cambio favorable de la situación epidemiológica en relación con esta enfermedad, condicionado por la aplicación de la vacuna VA-MENGOC-BC [5].

La envoltura celular de la *Neisseria meningitidis* está formada por la membrana externa y la citoplasmática, ambas separadas por el espacio periplasmático. La membrana externa está constituida por una bicapa lipídica donde se encuentran proteínas de diferentes pesos moleculares, lipopolisacáridos (LPS) y fosfolípidos. Toda esta envoltura celular está cubierta por una cápsula de polisacáridos, responsable de las inmunoreacciones que sirven para la clasificación en serogrupos, siendo actualmente reconocidos 13, denominados A, B, C, D, X,

Y, Z, 29E, W135 y más recientemente se han descrito los grupos II, I, K y L. De estos, los A, B, C, Y y W135 son los causantes principales en el mundo de la enfermedad, dentro de los cuales el B ha alcanzado dramáticas proporciones [3,6].

La vacuna cubana VA-MENGOCC-BC está compuesta por proteínas de la membrana externa del meningococo B enriquecida con un complejo antigénico de alto peso molecular que le permite desarrollar una respuesta inmune diversa contra los diferentes serotipos del grupo B, y se conjuga además, con uno o varios polisacáridos capsulares de otros meningococos cuando se desea una vacuna polivalente [3].

Los estudios realizados de la respuesta inmune de anticuerpos de VA-MENGOCC-BC han evaluado la respuesta de anticuerpos por ELISA y por Western-blot [7]. No obstante, la utilización de radioisótopos sería de gran utilidad en la confirmación de los resultados obtenidos hasta el momento, así como la valoración de esta respuesta del organismo.

Teniendo en cuenta lo antes expuesto los objetivos del trabajo fueron:

- realizar el marcaje de las proteínas fundamentales de VA-MENGOCC-BC con vistas a estudios inmunológicos.
- comparar tres métodos de yodación diferentes: Yodogén, Cloramina-T y Lactoperoxidasa.
- definir cualitativamente los componentes marcados del complejo proteico.

## MATERIALES Y METODOS

Para este estudio se utilizaron proteínas de membrana externa de meningococo B obtenidas según metodología de la vacuna cubana antimeningocócica BC [8], procedentes del laboratorio de proteínas del Instituto Finlay.

El marcaje se realizó con proteínas disueltas y proteínas conjugadas con polisacáridos de meningococo del grupo C, en concentraciones de 2.156mg/ml y 0.322mg/ml respectivamente, determinadas por el método de Lowry [9].

Todos los reactivos utilizados son de calidad p.a de firmas internacionales reconocidas.

El equipamiento utilizado pertenece a firmas reconocidas.

### Método de yodación por Cloramina-T.

En dos tubos plásticos de 1ml se adicionaron 50µl de de solución tampón fosfato sódico 0.2M pH 7.2, con albúmina bovina al 2% (PBS) y 30µg de proteínas disueltas y conjugadas respectivamente, 0.1mCi de NaI-125 (JMS-30 Amersham), 50µg de Cloramina-T (2.5mg/ml). Se agitaron durante 1 minuto y se detuvo la reacción con 125µg de metabisulfito de sodio (2.5mg/ml), posteriormente se adicionaron 100µg de yoduro de potasio (2mg/ml) [10].

### Método de yodación por yodogén.

En el fondo de dos tubos plásticos de 1ml se depositaron 2µg de yodogén a una concentración de 0,02mg/ml disuelto en diclorometano el cual fue evaporado posteriormente en atmósfera de nitrógeno.

Se adicionaron a ambos tubos 50µl de PBS, 30µg de proteínas disueltas y conjugadas respectivamente, 0.1mCi de NaI-125, se incubó durante 15 minutos. Al término de la

incubación se transfirió el contenido de los tubos de reacción a otros tubos que contenían 200µl de PBS [11,15].

#### Método de yodación por Lactoperoxidasa.

En dos tubos de 1ml se adicionaron 25µl de PBS, 30µg de proteínas disueltas y conjugadas respectivamente, 0.1mCi de NaI-125, 10µl de lactoperoxidasa (0.5mg/ml) y 10µl de peróxido de hidrógeno (dilución 1/30000). Esta mezcla se agitó e incubó durante 3 minutos. La reacción se detuvo con 0.5ml de PBS [11].

#### Purificación de las mezclas de reacción.

Para la purificación de las reacciones de yodación se utilizó una columna cromatográfica de dimensiones 5.5 X 1.5cm rellena con Sephadex G-25 (exchable - Merck). Las condiciones de purificación fueron:

- eluyente: PBS.
- flujo 15ml/hora.
- recolección de fracciones de 0.5ml
- detección de picos: por radioactividad.

#### Cálculos de las actividades específicas.

A partir del perfil de elución obtenido en el proceso de purificación, se calcularon los parámetros de yodación [11].

Rendimiento de Yodación (R.Y):

$$R.Y (\%) = \frac{\text{conteos de proteínas marcadas}}{\text{conteos totales}} \times 100$$

Actividad Incorporada (A.I):

$$A.I (\mu\text{Ci}) = \frac{\text{rendimiento de yodación} (\%)}{100} \times \text{actividad inicial de I-125}$$

Actividad Específica (A.E):

$$A.E (\mu\text{Ci}/\mu\text{g}) = \frac{\text{actividad incorporada}}{\text{masa de proteínas marcadas}}$$

#### Determinación de pureza radioquímica del producto marcado [18].

Una vez realizada la purificación de la mezcla de yodación se obtuvieron dos picos, uno correspondiente a las proteínas marcadas purificadas y otro al I-125 remanente.

La determinación del pico de proteínas marcadas con I-125 una vez purificadas, fue mediante la precipitación de una alícuota de proteínas con ácido tricloroacético (TCA). Para

ello , a un tubo plástico de 1ml que contenía 100µl de PBS, se adicionaron 100µl de proteínas marcadas en una dilución de 20000 cpm por cada 100µl de solución y 100µl de TCA al 10%. Se centrifugó el vial de reacción durante 5 minutos a 3000rpm y posteriormente se tomaron alícuotas del sobrenadante de 200µl, las cuales se cuantificaron en el contador gamma.

El cálculo del porcentaje de proteínas se realizó por la siguiente expresión:

$$\% \text{ proteínas} = \frac{Ct - 2Cs}{Ct}$$

donde

Ct: conteos totales adicionados al tubo de reacción.

Cs-Conteos del sobrenadante.

La determinación de la pureza radioquímica de las proteínas marcadas se realizó por cromatografía de papel, se aplicaron 10µl de las proteínas marcadas en tiras de papel Whatman-I de dimensiones 1.5 X 20cm y como solvente se empleó Metanol al 85%. Las tiras de papel se secaron después de las corridas y cortaron en segmentos de 0.5cm, los cuales fueron medidos en el contador gamma. El pico de proteínas marcadas quedó en el comienzo del cromatograma y el I-125 corrió con el frente del solvente.

Los porcentajes de pureza se determinaron por la expresión:

$$\% \text{ proteínas} = \frac{\text{conteos del pico proteico}}{\text{conteos totales}} \times 100$$

$$\% \text{ de yodo libre} = 100 - \% \text{ proteínas}$$

### Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Las proteínas marcadas fueron analizadas en geles de SDS Poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) . La electroforesis se desarrolló en una minicámara (BIORAD), con 35mA, durante 1hora. Se aplicaron aproximadamente 200 000 cpm de las proteínas marcadas por pozo. En la corrida se introdujo un patrón de proteínas sin marcar como medio de comparación en la identificación de los pesos moleculares de las proteínas marcadas.

Una vez concluida la corrida se realizó la coloración de las proteínas con azul de coomassie con el objetivo de visualizar los patrones sin marcar [12].

### Autorradiografía

Los geles SDS-PAGE fueron secados en un secador de geles y se realizó la autorradiografía (Kodak Diagnostic), durante 72 horas a -70°C, con el objetivo de visualizar las moléculas marcadas [13].

### Análisis Estadístico.

Los resultados de los marcejes fueron analizados por un test de Student para comparación de medias.

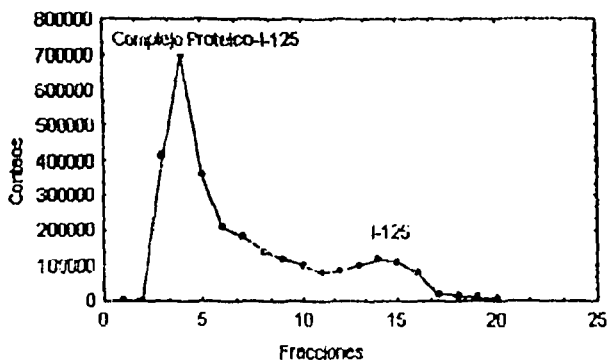
## RESULTADOS Y DISCUSION

Un factor importante en la reacción de yodación lo constituye la masa de proteínas a utilizar. Teóricamente puede ser calculada la masa ideal de una proteína para así lograr los menores daños posibles y un valor de actividad específica deseado. Sin embargo, cuando se trata de marcar varias proteínas a la vez, el establecimiento de la masa óptima a yodar es un parámetro bastante complejo, pues ellas están en distintas concentraciones dentro del complejo y el nivel de yodación de cada una dependerá de factores tales como la concentración de grupos tirostínicos en cada molécula, distribución de ellos dentro de la molécula, su concentración en la periferia de la estructura proteica, así como la influencia de los efectos estéricos de las estructuras moleculares. [11]. Por estas razones, teniendo en cuenta la experiencia de trabajos anteriores en el marcaje de complejos proteicos [10], se determinó utilizar 30µg del complejo en cada reacción de yodación.

Las concentraciones de los agentes oxidantes y reductor (para la yodación por Cloramina-T) se tomaron a partir de metodologías de marcaje establecidas con anterioridad [10].

La figura 1 muestra un perfil típico del proceso de purificación del complejo proteico marcado.

Fig 1. Purificación del Complejo proteico yodado.



Las tablas I y II muestran los resultados de los marcajes de las proteínas disueltas y conjugadas respectivamente. En ellas se ofrecen los parámetros de yodación en cada caso (rendimiento de yodación y actividad específica) así como la pureza radioquímica obtenida utilizando la técnica de radiocromatografía. Por último se ofrecen también los porcentajes de proteínas obtenidos por la precipitación con TCA.

Tabla I. Marcajes con I-125 de las proteínas disueltas de VA-MENGOX-BC.

No	Técnica	R.Y (%)	A.E ( $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ )	Pureza RQ (%)	Precip.TCA (%)
1	Yodogén	76	1.7	95	72
2	Yodogén	65	1.2	90	80
3	Yodogén	66	1.4	91	75
media		69.0	1.4	92	76
4	Lactoperox.	77	2.1	93	79
5	Lactoperox.	63	1.9	90	84
6	Lactoperox.	54	1.4	90	83
media		64.6	1.8	91	82
7	Cloramina-T	31	0.7	93	75
8	Cloramina-T	35	0.9	90	80
9	Cloramina-T	28	0.5	89	75
media		31.3	0.7	91	77

Tabla II. Marcajes con I-125 de las proteínas conjugadas de VA-MENGOX-BC.

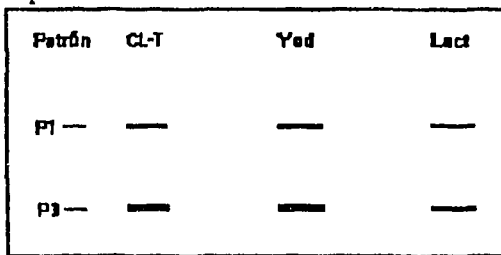
No	Técnica	R.Y (%)	A.E ( $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ )	Pureza RQ (%)	Precip. TCA (%)
1	Yodogén	41	0.8	90	85
2	Yodogén	43	1.0	84	87
media		42	0.9	87	86
3	Lactoperox.	1	-	-	-
4	Lactoperox.	1	-	-	-
media		-	-	-	-
5	Cloramina-T	44	0.8	90	80
6	Cloramina-T	46	1.3	94	83
media		45	1.05	92	82

Para la tabla I se hizo una comparación de las medias de actividades específicas y de rendimiento de yodación, por el test de Student, dando como resultado que no había diferencias significativas entre los marcajes de Yodogén y Lactoperoxidasa, pero al comparar éstos con la Cloramina-T sí se manifestaban estas diferencias, para un 95% de confiabilidad.

En los marcajes por Yodogén y Lactoperoxidasa de las proteínas disueltas se obtienen incorporaciones de I-125 bastante elevadas y actividades específicas dentro del rango necesario (mayor de  $1\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ) para su posterior utilización en la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida [12]. En el caso del método de la Cloramina-T [14], estos valores son algo menores, lo que se le atribuye a la metodología escogida para esto (concentraciones de la cloramina-T y metabisulfito de sodio fijas y el tiempo de reacción 1 minuto), quizás la variación de estos parámetros podría arrojar mejores resultados [18]. Los parámetros de pureza y el valor de TCA en los tres casos son aceptables y similares.



Esquema 1. SDS-PAGE y autorradiografía de proteínas disueltas de VA-MENGRXX-BC marcadas con I-125 por diferentes métodos.



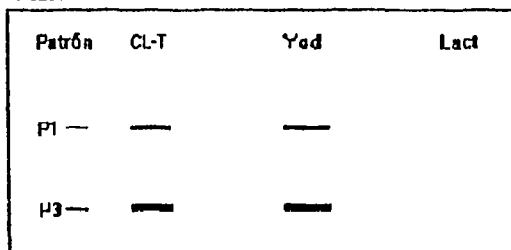
Para la tabla II se efectuó la comparación de medias mediante el test de Student y se demostró que para un 95% de confiabilidad, no existen diferencias significativas entre los valores de actividad específica y de rendimiento de yodación calculados.

En el caso de la yodación de las proteínas conjugadas, los resultados de los porcentajes de incorporación y de actividad específica obtenidos por el método del yodógeno [15] y la cloramina-T [14] son similares. La utilización del yodógeno dio resultados algo menores que los obtenidos para las proteínas disueltas, lo cual se puede explicar teniendo en cuenta que en este caso las proteínas no se encuentran en forma individual, sino que forman parte de un conjugado en el cual intervienen polisacáridos. De esta forma entran a jugar un papel importante los efectos estéricos provocados por los polisacáridos. Otro factor que pudiera intervenir en la disminución de estos parámetros es la concentración de las proteínas conjugadas que se emplea en la reacción de yodación, lo que provocó un aumento del volumen de la reacción [11].

Los marcajes por lactoperoxidasa de las proteínas conjugadas dieron resultados negativos.

El esquema 2 refleja una representación gráfica de las autorradiografías en geles de poliacrilamida obtenidas para las proteínas conjugadas utilizando los distintos métodos de marcaje.

Esquema 2. SDS-PAGE y autorradiografía de las proteínas conjugadas de VA-MENGOC-BC marcadas con I-125.



Los esquemas 1 y 2 nos muestran que las proteínas marcadas que pueden ser detectadas en las condiciones de nuestros experimentos fueron P1 y P3 fundamentalmente, de acuerdo al patrón de proteínas frías disueltas y conjugadas. Según se observa en todos los casos y métodos empleados las proteínas marcadas presentan cualitativamente la misma intensidad de marcaje, con excepción del marcaje con Lactoperoxidasa de las proteínas conjugadas.

Estudios sobre la estabilidad de las proteínas marcadas mostró que a los 15 días de realizada la yodación éstas no presentaron alteraciones significativas, según las electroforesis en geles de poliacrilamida y autorradiografías.

Por último se ofrece una valoración de los métodos utilizados en el marcaje de las proteínas de VA-MENGOC-BC. Desde el punto de vista tecnológico éstos son bastante sencillos y rápidos con sus ventajas y desventajas cada uno [11,15,16]. En nuestro caso los resultados obtenidos por los tres métodos fueron similares para las proteínas disueltas y para las conjugadas por sólo dos de ellos (Cloramina-T y Yodogén). Pero desde el punto de vista económico el método de la Cloramina-T es el más ventajoso pues los otros requieren reactivos más costosos [17].

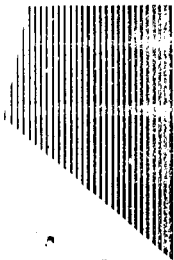
### CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron los complejos de proteínas de la vacuna VA-MENGOC-BC marcados con I-125 con los parámetros adecuados para posteriores estudios inmunológicos.
2. Las proteínas disueltas se marcan por los tres métodos utilizados con resultados similares en cuanto a actividad específica ( $1\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ).
3. Las proteínas conjugadas pueden ser marcadas por dos métodos (Cloramina-T y Yodogén), con resultados similares en cuanto a actividad específica ( $1\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ).
4. Se determinó que las proteínas marcadas con I-125 en todos los casos fueron P1 y P3 por su visualización en las autorradiografías.

### BIBLIOGRAFIA

1. Katy, H y col. Sero- and subtypes of group B Meningococci causing Invasive Infections in Finland in 1067-87. *Scand. J. Infect. Dis.*; 21: 527-535. 1989.
2. Vaerárcel, N. M. y col. Enfermedad meningocócica en Cuba. Cronología de una enfermedad. Editorial de Ciencias Médicas. 1991.
3. Sierra V. G., Campa, C. VA-MENGOC-BC. Vacuna contra la enfermedad meningocócica de los grupos B y C. Centro nacional de vacuna antimeningocócica. Minsap-Cuba. 1992.
4. Martínez Cruz, J. A. Estudio Bacteriológico de 340 casos de meningitis purulenta en la infancia. *Rev. Cub. Lab. Clin.* 19: 257-270. 1947.
5. Almeida, L. y col. Estudio de portadores de Neisseria meningitidis en adolescentes militares sometidos a régimen de internado. Centro Nacional de Vacuna antimeningocócica, Centro Provincial de Higiene y Epidemiología, Ciudad de la Habana. 1990.
6. Comportamiento de las enfermedades transmisibles en Cuba. Ministerio de Salud Pública. Cuadro Epidemiológico nacional. p: 1-20. 1937.
7. Sierra, V. G. y col. Evaluation of the meningococcal disease serogroup B. *Proceeding of Sixth International Pathogenic Neisseria Conference.* Atlanta. EEUU. 1988.

8. Vacuna cubana antmeningocócica. Patente 1133.
9. Lowy, O.L. J. Biol. Chem. 193. 265-275. 1951.
10. Ruiz, M.; Cancio, E.; Palencio, E. Caracterización y validación de diferentes antígenos del VIH-1 para su utilización en el RIPA-I-125. ISCIN-CENTIS, Tesis de Grado. 1991.
11. Bolton, A. E. Radiiodination techniques. Review 18. Amersham Corporation. 1977.
12. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680. 1970.
13. Dissous, C. D. y col. Isolation and characterization of surface antigens from schistosoma mansoni: schistosomula. 1981.
14. Greenwood, F. C.; Hunter, W. M. y Glover, J. S. The preparation of I-131-labelling human growth hormone of high specific radioactivity. Bioch. J., 103: 120-124. 1963.
15. Fraker, P. J. y Speck, J. C. Bioch. and Bioph. Research Communications, 80: 849-857. 1978.
16. Marchalonis, J.J. Bioch. J., 113: 299-305. 1971.
17. Catálogo Amersham. Life Science Products. 1992.
18. Caso, R y Arranz, C. Evaluación de Prolactina Humana de Producción nacional para su empleo en Radioinmunoanálisis (RIA). CIEN-R, 24-96, 1996.



**CIE**

**CENTRO DE INFORMACION  
DE LA ENERGIA NUCLEAR**

Calle 20 No. 4113 e/ 18A y 47, Playa

Telf.: 22-7527. Fax: 331188.

E mail: [cien@ceniai.cu](mailto:cien@ceniai.cu)