

Identificación y caracterización biológica de la proteína viral UL-18 en la infección por citomegalovirus humano

Tte. Aux. QB Claudia L. Juárez Villanueva,* Dr. Vianney Ortiz Navarrete,** Dr. Armando Isibasi Araujo,**
Gral. Brig. Rafael Santana Mondragón,*** Subtite Aux. QB Rosana Pelayo Camacho*

Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea. Ciudad de México

RESUMEN. El citomegalovirus humano (HCMV) es un patógeno ubicuo que persiste en el huésped y es capaz de causar enfermedad severa en el individuo inmunocomprometido y en el feto. Se conoce la existencia de una proteína viral, UL-18, que presenta alta homología con la cadena α de la molécula de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (HLA-I). La expresión, así como la permanencia intracelular de esta proteína pueden tener significancia y serias implicaciones en el destino de las moléculas HLA-I. Los ensayos *in vitro* realizados en este trabajo revelan una disminución de la densidad de moléculas de clase I en la superficie de fibroblastos de pulmón humano (MRC-5) infectados con dosis bajas de HCMV. Con el fin de determinar si hay expresión y cuál es el estado físico de la proteína transmembranal UL-18, la cual presumiblemente puede estar involucrada en este fenómeno, se identificaron, mediante algoritmos matemáticos, epitopos de células B de UL-18, y de ellos se seleccionaron dos regiones no homólogas entre la proteína viral y HLA-I. Los péptidos sintéticos obtenidos, conjugados a moléculas acarreadoras, se emplearon para la producción de IgG policlonal (pAb). El pAb UL-I mostró una elevada reactividad únicamente a UL-18 y no a HLA-I, lo que permitió evidenciar que durante la infección por HCMV hay una franca expresión del producto del gen UL-18, evento que al parecer se lleva a cabo desde etapas tempranas de infección. La proteína muestra un peso molecular de alrededor de 67 kDa, indicando que probablemente los 13 sitios de glicosilación predichos en ella ya la han sufrido, lo que habla de su capacidad de viajar a Golgi y madurar.

Palabras clave: citomegalovirus humano, moléculas de clase I del HLA, UL-18, evasión inmune.

SUMMARY. Human cytomegalovirus (HCMV) is an pathogenic agent that remains ubiquously in host and it is always in condition to produce severe disease in the immuno-defficient individuals as well as in foetus. It is well known the existence of the viral protein UL-18 which is heighly homologic to the alpha-chain from the class-I molecule of the main hystocompatibility complex (HLA-I): Either its expression or the intracellular presence of such a protein can produce alterations in the outcome of the HLA-I molecules. In vitro trials carried out in the present paper have demonstrated a decrease in the density of the class-I molecules in the surface of human fibroblasts in lungs (MRC-5) infected by low-dose of HCMV. Epytopes of B-cells of UL-18 have been identified by mathematic algorithms in order to determine their expressivity and the physical condition of the UL-18 trans-membrane protein, which is supposed to be involved in this process. Two non-homologous regions between viral protein and the HLA-I were selected for study. The obtained synthetic peptides attached to carrier molecules were employed in production of polyclonal IgG (pAb). The pAb UL-I demonstrated high reactivity to UL-18 but not to HLA-I. This allowed us to remark that during the infection by HCMV there is a high expression of the UL-18 gene products, which seems to be present since the very early stages of infection. Molecular weight of protein is about 67 kDa, which indicates that the 13 points of glycosilation have already occurred, so it is able to its own transportation to the Golgi and to become mature.

Key words: Human cytomegalovirus, class I molecules of HLA, UL-18, immune evassion.

*Departamento de Inmunología, Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, UDEFA.

** Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

*** Laboratorio Multidisciplinario de Investigación. Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Coordinador Nacional de Enseñanza. Originalmente Director E.M.G.S.

Correspondencia:

Tte. aux. QB Claudia L. Juárez Villanueva
Escuela Militar de Graduados de Sanidad
Laboratorio Multidisciplinario
Lomas de Sotelo. México 11200
Tels. 520-1545, 540-7226 Ext 456

El citomegalovirus humano (HCMV) es una de las principales causas de morbimortalidad en recién nacidos e individuos inmunosuprimidos.¹⁻³ Hasta el momento no se cuenta con un tratamiento profiláctico que ayude a organismos inmunocomprometidos a resolver una infección, lo que se debe, en gran medida, a la falta de entendimiento acerca del pobre reconocimiento inmune en etapas tardías de la infección, y obliga al asomo de los mecanismos moleculares intracelulares involucrados. El análisis de la secuencia nu-

cleotídica del genoma viral ha revelado la presencia de un marco de lectura abierto, cuyo producto de traducción predicho tiene alta homología con las moléculas de clase I del sistema principal de histocompatibilidad humano (HLA-I) de eucariotes superiores.⁴ Este hallazgo y la observación de que en células infectadas por HCMV hay una disminución de la expresión de moléculas de clase I maduras en la superficie (con un nivel inalterado de RNAm de cadena α),^{3,6} permiten especular que existe un mecanismo de evasión del HCMV a la respuesta inmune, y sugerir la participación de UL-18 mediante el posible secuestro de la $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2m$) en retículo endoplásmico, lo que haría a la célula infectada irreconocible para las células T citotóxicas. Con tal motivo son necesarias la identificación, localización y determinación del estado de asociación y cinética intracelular de UL-18 y cadena α con $\beta 2m$, mediante el diseño de péptidos con propiedades inmunogénicas de regiones no homólogas entre ambas moléculas y la elaboración de anticuerpos en animales de experimentación.

Material y método

Células. Se cultivaron fibroblastos de pulmón fetal humano (MRC-5) a 36.5° C en atmósfera de 5% de CO₂, en medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y suplementado con 10% de suero fetal de bovino y 0.03% de L-glutamina.

Virus, infección viral y obtención de antígeno. HCMV cepa AD-169 fue propagado en células MRC-5 en medio DMEM suplementado con 2% de suero fetal bovino. La infección se realizó con una dosis viral capaz de producir un efecto citopático en el 90% de la monocapa a los 7 días post-infección. El proceso de absorción viral se llevó a cabo durante 2 horas, después de lo cual el virus se incubó con las células el tiempo necesario para el análisis de las proteínas por electroforesis y/o citometría de flujo. Los antígenos (extractos celulares totales) de células MRC-5 y MRC-5 con crecientes tiempos de infección. El antígeno se preparó por sonicación de las suspensiones celulares.

Inmunofluorescencia indirecta. El estudio de densidad de moléculas de clase I de HLA en superficie celular se realizó mediante citometría de flujo en un equipo FACSsort Beckman Ins. a diferentes tiempos de infección mediante el empleo del mAb W6/32 específico para cadena α unida a $\beta 2m$ de HLA-I y la posterior tinción con FITC.

Alineamiento de secuencias y predicción de epitopos. El alineamiento de las secuencias peptídicas predichas del producto del gen UL-18 con la cadena α de las moléculas de clase I (HLA-A2), así como la predicción de epitopos, se realizaron mediante los programas Anigen, Flexpro y Novotny del paquete computacional PCGENE de Intelligentic Inc., asignando ventanas de 6 aminoácidos.

Obtención de péptidos sintéticos. Se elaboraron 2 péptidos para UL-18, el HCMV1 (GGVRNQNDNRA) posición 215-225 y el péptido HCMV2 (GNWTVEIPISV) posición 290-300; se empleó un sintetizador automático Synergy 432

de Applied Biosystems con la tradicional química FMOC mediante activación de HBTU.⁷⁻⁹ El análisis de pureza se llevó a cabo en un equipo Waters 996 programa Millennium con una columna analítica c-18 de fase reversa Delta-Pack 300 Å, partícula de 15 μm , 3.9 mm x 30 cm waters mediante gradiente de acetonitrilo con una longitud de onda de detección de 220 y 280 nm mediante un fotodiodo detector de arreglo waters 990.

Obtención de IgG de conejo y análisis de la reactividad de los pAb. Se utilizó un equipo Imject Immunogen EDC Conjugation kit 77101 (Pierce) para la conjugación de los péptidos sintéticos a BSA, KLH y HEL.¹⁰ Se inmunizaron conejos blancos Nueva Zelanda de 2.5-3.5 Kg con 1 mg de péptidos 1 y 2 de UL-18 conjugados a BSA y KLH con adyuvante completo e incompleto vía subcutánea y 500 μg de péptido crudo vía intravenosa. La purificación se llevó a cabo a través de precipitación con sulfato de amonio saturado y cromatografía de afinidad con una columna de proteína A-Sepharosa levigando a pH 2.4 con glicina-HCL 0.2 M. La evaluación de la reactividad y especificidad de los sueros y anticuerpos policlonales (pAb) purificados UL-1 y UL-2 se realizó mediante ELISA¹¹ en placas de 96 pozos Nunc Co. recubiertas de 5 μg /pozo de péptidos 1 y 2 conjugados a HEL en amortiguador de carbonatos pH 9.6 probándose con los sueros a diluciones seriadas y pAb a 1,5 y 10 μg .

Detección de UL-18 en células MRC-5 infectadas con HCMV. La electroforesis de proteínas de células no infectadas y con una cinética de infección se realizó en presencia de duodecil sulfato de sodio en condiciones reductoras y sistema de amortiguador discontinuo según lo descrito por Laemmli.¹² Las proteínas corridas en electroforesis fueron transferidas a papel de nitrocelulosa durante 2 horas según lo descrito por Towbin y col.¹³ y fueron teñidas con Ponceau, las uniones no específicas fueron bloqueadas con 1.5% de gelatina en PBS, posteriormente, se incubaron con 5 μg del pAb UL-1 por 3 horas a 37° C; el revelado se llevó a cabo con antisuero de cabra conjugado a peroxidasa Gibco-BRL y diaminobencidina-peróxido de hidrógeno 0.08.

Resultados

La identificación primaria del virus se realizó por la producción de efectos citopáticos en el 90% de la monocapa en un tiempo de 7 días (Figura 1).

El análisis de la expresión en superficie de HLA-I por inmunofluorescencia indirecta a través de citometría de flujo (FACSORT) (Figuras 2b, c, d y e) mostró un efecto de marcada reducción gradual de estas moléculas en células infectadas desde las 12 horas post-infección hasta las 72 horas, en comparación con las células no infectadas (Figura 2a).

El alineamiento por computadora de las secuencias de residuos de aminoácidos predichos del gen UL-18 de HCMV (368, incluyendo la secuencia líder de 18 aa) y de cadena pesada de la molécula de clase I de HLA-A (341, a partir del codón de iniciación) indicó un 19.9% de identidad y 10% de similitud entre ambas moléculas, en un marco

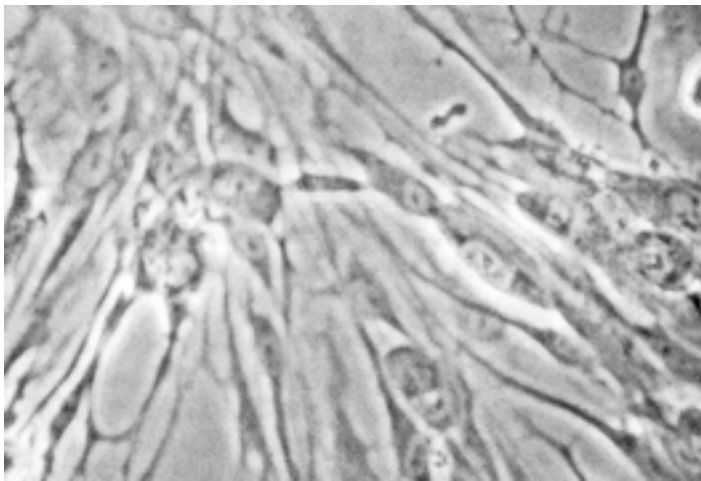
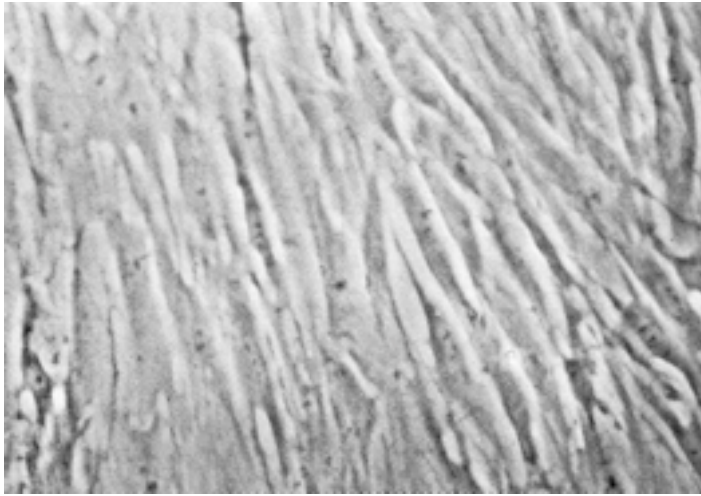


Figura 1. Efecto citopático en la infección de fibroblastos humanos por citomegalovirus AD-169. 1a: Células no infectadas, 1b: Células con 7 días de infección.

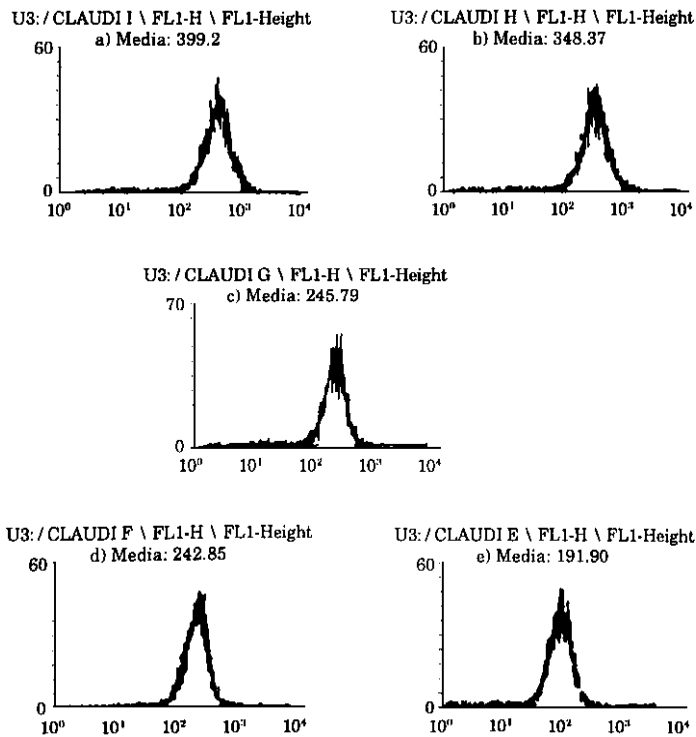


Figura 2. Histograma de fluorescencia indirecta de la expresión en superficie de MRC-5 de moléculas de clase I del HLA. a) células sin infectar, b) células infectadas con HCMV AD-169 12 h, c) 24 h, d) 48 h, e) 72 h.

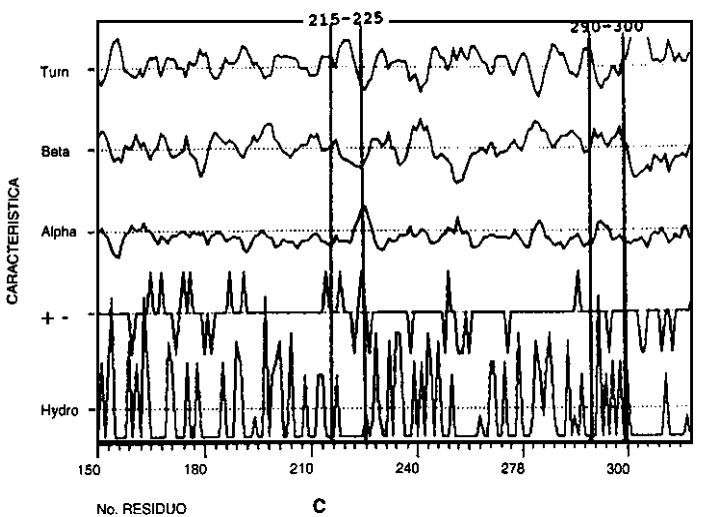
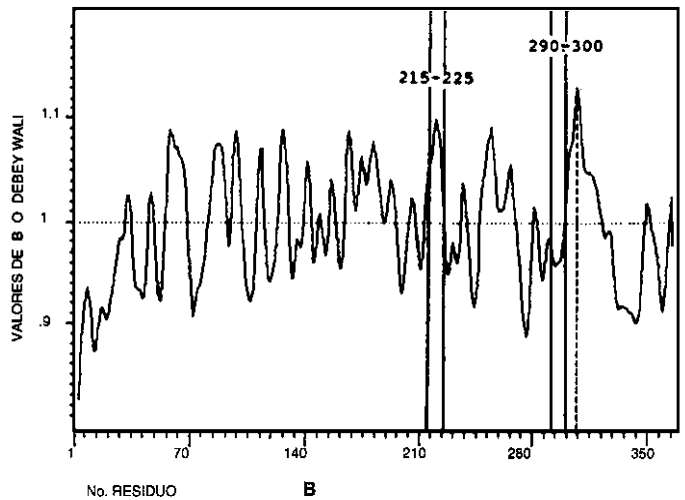
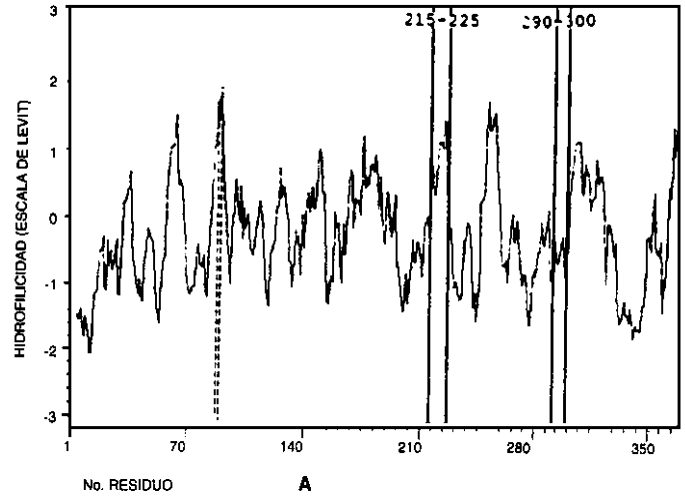


Figura 3. Predicción de epitopos de células B en la proteína UL-18. a) Perfil de hidrofiliidad (Hopp y Woods, antigen-PC Gene), b) Perfil de flexibilidad (Karpluz y Shulz, flexpro-PCgene), c) Perfil de estructura secundaria (Novotny, Pc Gene).

abierto de lectura que implica la adición de 4 gaps para UL-18 y 8 para HLA-A2 únicamente. Se consideraron aminoácidos similares A,S,T; D,E; N,Q; R,K; I, L, M, V; F, Y, W. Los segmentos identificados como de mayor heterogeneidad continúan en el dominio alfa-3 de ambas secuencias que corresponden a las regiones 215-225 (GGVRNQNDN-RA) y 290-300 (GNWTVEIPISV) de UL-18; denominadas HCMV1 y HCMV2 respectivamente.

El péptido HCMV1 mostró ser un buen candidato a epitopo de B, a juzgar por los valores obtenidos de acuerdo a los programas de predicción Antigen, Flexpro y Novotny, ya que el valor de hidrofiliidad asignado se encuentra dentro de los 4 más altos, muestra alta flexibilidad, alta densidad de cargas, y la región carboxilo-terminal toca el pico más alto de estructura alfa-hélice y vueltas presentes en la molécula completa (Figura 3). El péptido HCMV2, por el contrario, carece de altos valores de hidrofiliidad, flexibilidad y posee más estructuras beta plegadas que alfa-hélices.

El seguimiento del procedimiento de síntesis de péptidos a través del monitoreo de la conductividad demostró un buen acoplamiento de los aminoácidos, que dio como resultado un alto rendimiento en la producción.

Los cromatogramas de análisis por HPLC de fase reversa de los péptidos sintetizados mostraron una excelente pureza (Figura 4). Los tiempos de retención de los péptidos fueron:

Péptido HCMV1 (215-225): 15.6 min.

Péptido HCMV2 (290-300): 34.65 min.

La prueba de ELISA reveló una franca reactividad y especificidad del suero antipéptido 1 conjugado a BSA y KLH, mayor que la mostrada por el suero antipéptido 2 (Figura 5), lo que concuerda con la predicción de antigenicidad realizada. Por esta razón la determinación de la expresión de UL-18 y su búsqueda se realizaron utilizando únicamente las inmunoglobulinas purificadas reactivas al péptido 1 (UL-1).

El corrimiento electroforético de las proteínas provenientes de células infectadas con HCMV y células no infectadas mostró un patrón de proteínas, en ambos casos, que presentan pesos moleculares desde 29 kDa hasta 100 kDa.

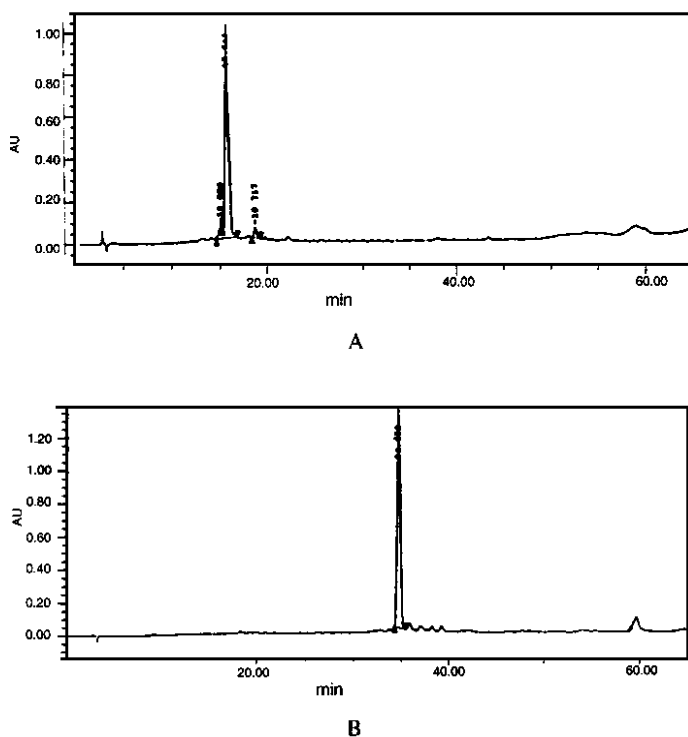


Figura 4. Cromatogramas analíticos de los péptidos sintéticos de UL-18 (HPLC). a) HCMV-1, tiempo de retención 15.6 min; b) HCMV-2, tiempo de retención 34.65 min.

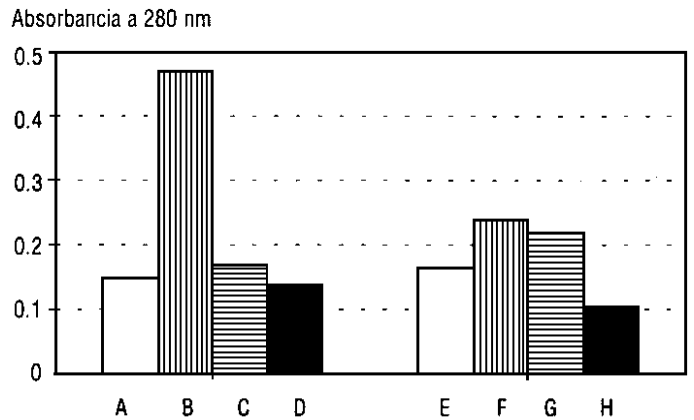


Figura 5. Reactividad de sueros policlonales pAb UL-1 y pAb UL-2 (ELISA). (a,b,g). Antígeno péptido HCMV-1; (e,f,c). Antígeno péptido HCMV-2; (a,e.) Sueros preinmunes; b,d Suero anti-HCMV (UL-1) 1:80; c) Suero inmune UL-1 1:1; (d,h) Antígeno HEL; (f,h) Suero anti-HCMV-2 (UL-2) 1:80; g) Suero inmune UL-2 1:1.

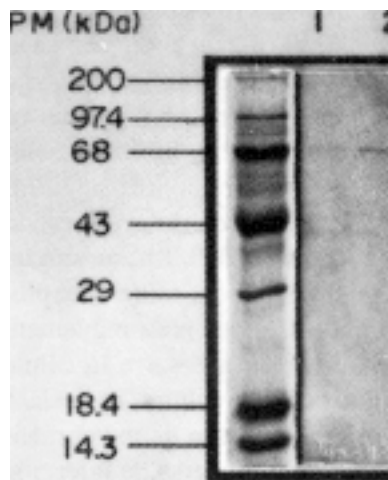


Figura 6. Inmuno-electrotransferencia de proteínas de células MRC-5 (carril 1) y células infectadas durante 72 horas con HCMV (carril 2). Tinción con pAb UL-1.

El ensayo "tipo Western" con antígeno HCMV-MRC-5 y MRC-5 muestra claramente una banda de aproximadamente 68 kDa, reconocida por el pAb UL-1 únicamente en células infectadas, y una tenue banda a la altura de 45 kDa tanto en células infectadas, como en no infectadas (Figura 6).

Cuando se hizo la cinética de infección y los antígenos extraídos de cada punto se enfrentaron al pAb UL-1, se pusieron de manifiesto dos bandas de proteína, una de aproximadamente 68 kDa, y otra de 57 kDa. El carril correspondiente al corrimiento de células vírgenes no mostró banda alguna.

Discusión de resultados

Sin duda, la función básica del sistema inmune es la de asegurar la integridad del individuo, inclusive la protección contra microorganismos y parásitos, mediante la comunicación a través de interacciones moleculares y celulares que tienden a mantener un equilibrio homeostático dentro del reconocimiento de lo propio y extraño. Cualquier desplazamiento de este equilibrio desencadenará todas las fases de la

respuesta inmune. En un intento de control, sobrevivencia y permanencia en el organismo huésped, algunos microorganismos, dentro de los que destacan varios virus, han desarrollado evolutivamente formas y mecanismos de prevención de aquel desencadenamiento y de evasión a la detección por el sistema inmune. Tal evolución puede incluir la regulación negativa de la expresión de moléculas de histocompatibilidad, a través de las cuales se da inicio al reconocimiento "íntimo" de lo extraño, en células infectadas por virus.

Existen evidencias de que en la infección *in vitro* por citomegalovirus humano hay una resistencia a la lisis mediada por linfocitos T citotóxicos, lo que pudiera obedecer a la falta de comunicación con el sistema de defensa, por una reducción en la expresión de moléculas de histocompatibilidad.

El análisis de inmunofluorescencia indirecta realizado por citometría de flujo en este trabajo permitió evidenciar, como se muestra en la *figura 6*, una franca disminución en la expresión en superficie celular de las moléculas HLA-I en fibroblastos infectados con HCMV AD 169 a partir de las 24 horas, a una densidad viral que revela efecto citopático en el 90% de las células a los 7 días post-infección. Este hallazgo permite, por un lado contar con un sistema reproducible en el laboratorio para su utilización en diversos estudios moleculares de la infección viral, y por otro, confirmar la influencia de HCMV en el fenómeno. El experimento llevado a cabo con virus inactivados con calor (56°C, 1 h) mostró un efecto similar, aunque menos pronunciado, sobre la expresión de HLA-I (datos no mostrados), lo que presumiblemente evidencia que el virus es capaz de acceder a la célula cuando se encuentra despojado de su envoltura, es decir, a través de un mecanismo alternativo a la fusión de membranas viral-celular, y obliga al empleo de un sistema de infección viral no relacionado para la verificación del efecto específico de HCMV. Se propone también el uso de un sistema en células no permisivas (probablemente monocitos humanos), en el cual no se lleve a cabo replicación viral y por lo tanto traducción de mensajero, para descartar (o incluir) la posibilidad de que la regulación se lleve a cabo a nivel transcripcional por efecto de genes virales.

Con estos antecedentes, la identificación, caracterización biológica y el rastreo de las posibles moléculas implicadas en el fenómeno resulta de vital importancia. El alineamiento por computadora de las secuencias genómicas de los genes UL-18 de HCMV y HLA A2 proporciona datos de una identidad del 19.9% y de similitud de 10%, con un marco de lectura abierto que implica la adición de un número mínimo de gaps, lo que concuerda con datos previamente publicados, y permite especular acerca de la posible actividad de competencia de UL-18 por la β -2 microglobulina con la cadena alfa de HLA-I.

Dado que la mayor carga de secuencias de aminoácidos variables de la molécula HLA-I se encuentra en los dominios alfa 1 y 2, en donde se postra el antígeno a ser presentado al sistema inmune, y que en el dominio alfa-3 de la molécula está un importante sitio de unión a β -2m (posición

258-263), se eligió como primer candidato a análisis y predicción de epitopos la secuencia de a.a. predicha correspondiente al dominio alfa-3 de UL-18.

Las semejanzas encontradas entre las proteínas predichas de los genes de UL-18 y HLA-I, sugieren que provienen de un gen ancestral común, pero no necesariamente indica que todos sus determinantes antigénicos sean compartidos, por lo que es predecible encontrar epitopos "públicos" (de familia, probablemente de la gran familia de las inmunoglobulinas) y "privados".

La necesidad de un anticuerpo que permita identificar y evaluar la "actitud" y actividad intracelular de UL-18 sin confusión con HLA-I obligó a que la predicción de epitopos de células B se hiciera consistentemente con regiones no compartidas entre ambas moléculas. Esta predicción, a través del programa PC Gene, indicó que existen regiones en el dominio alfa-3 de UL-18, por supuesto heterólogas a HLA-I, con propiedades antigénicas, de acuerdo a valores de hidrofiliidad, flexibilidad y densidad de cargas, que les permiten ser reconocidas por anticuerpos. Para conocer el tipo de estructura secundaria que presentan estas secuencias se realizó también un análisis utilizando el programa Novotny, en donde los perfiles de hidrofobicidad, hojas beta-plegadas, alfa hélices, vueltas beta y carga, nos proporcionaron evidencias de que la región de posición 215-225, con secuencia de a.a. GGVRNQNDNRA, constituía un excelente candidato para su síntesis y utilización en la elaboración de anticuerpos.

La síntesis y purificación de este péptido (HCMV-1) se llevó a cabo eficientemente, a juzgar por el rendimiento obtenido y el cromatograma de análisis por RP HPLC (Figura 4), en el que la aparición de un pico mayor indicó un producto predominante, sin presencia sustancial de contaminantes de grupos protectores.

El péptido purificado y acoplado bioquímicamente a proteínas acarreadoras como BSA y KLH fue apto para evocar una respuesta en conejos de anticuerpos específicos contra la proteína completa, demostrada mediante la reacción Ag-Ab en ensayos inmunoenzimáticos. El ensayo tipo "Western", utilizando inmunoglobulinas purificadas por cromatografía de afinidad (pAb UL-1), reveló el reconocimiento específico de una proteína viral (ya que no es reconocida en los fibroblastos no infectados) con un peso molecular de aproximadamente 67 kDa, cuando éste se realizó sobre un corrimiento electroforético de extractos totales de células infectadas y no infectadas, en donde se aprecia un patrón, general y compartido, de proteínas con pesos moleculares desde 29 kDa hasta 100 kDa. Cuando la reacción Ag-Ab se llevó a cabo sobre corrimientos de células con diferentes tiempos de infección hubo el reconocimiento evidente de la proteína, al parecer UL-18, de 67 kDa, con un pico máximo de expresión a las 48-72 horas, el que desciende al paso del tiempo. Además, es reconocible una banda que migra alrededor de 57 kDa. Si se toma en cuenta que la carga de aminoácidos de UL-18 darían un PM aproximado de 45 kDa, pero que tiene 13 sitios potenciales de glicosilación, esta-

mos presumiblemente ante la proteína viral completamente glicosilada, y la posibilidad de que la banda encontrada de 57 kDa corresponda a la misma molécula pero en otro estado de maduración es grande; aunque se propone realizar estudios de mayor sensibilidad y probablemente utilizar enzimas que nos permitan evidenciar grados de glicosilación para confirmarlo.

Al parecer, se ha logrado la identificación intracelular de la proteína UL-18, lo que afirmaría su expresión en la infección por citomegalovirus. La posibilidad de que UL-18 experimente un "encuentro" en espacio perinuclear con β -2 microglobulina o a lo largo del tránsito hacia la membrana, así como afinidad de la unión y el destino de las moléculas de histocompatibilidad, podrá ser experimentalmente estudiada a través de ensayos de "pulso y cazas" a diferentes tiempos de infección. Así mismo, será necesario ampliar los tiempos de infección con HCMV para los ensayos de fluorescencia indirecta (FACS) con análisis simultáneo de UL-18 y HLA-I.

Referencias

1. Stinski M. Molecular biology of cytomegalovirus replication. En: Monto Ho MD (ed). Cytomegalovirus: Biology and infection. New York, Plenum Medical Book Company. 1982:7-35, 57-73.
2. Stagno S, Pass RF, Dworsky ME y Alford CA. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. Semin Perinatol 1983;7:31-42.
3. Rasmussen LE. Gene products of cytomegalovirus and their immunologic significance. En: Monto Ho MD (ed). Cytomegalovirus: Biology and infection. New York, Plenum Medical Book Company, 1982:37-56.
4. Beck S, Barrel B. Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. Nature 1988;331:269-272.
5. Browne H, Smith G, Beck S, Minson T. A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus and β -2 microglobulin. Nature 1990;347:770-772.
6. Barnes PD, Grundy JE. Down-regulation of the class I HLA heterodimer and β 2-microglobulin on the surface of cells infected with cytomegalovirus. J Gen Virol 1992;3:2395-2403.
7. Atherton E, Clive DLJ, Sheppard RC. Polyamide supports for polypeptide synthesis. J Am Chem Soc 1975;97:6584-6585.
8. Atherton E, Logan CJ, Sheppard RC. Peptide synthesis. Part 2. Procedures for solid-phase synthesis using N-Fluorenylmethoxycarbonylamino-acido on polyimide supports. Synthesis of substance P and of acyl carrier protein. J Chem Soc Perkin I 1981:538-546.
9. Maloy WL, Coligan JE. Peptide synthesis. En: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DM, Shevach EM, Straber W. National Institutes of Health. Current protocols in immunology et: NY USA. Greene publishing associates and Wiley Interscience, Wiley and sons. 1991:911-916.
10. Williams A, Ibrahim I. A new mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-Ethyl-3 -(dimethylamino) propyl)-carbodiimide (EDC). JACS 1981;103:7090-7095.
11. Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunochem 1971;8:874-879.
12. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685.
13. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76:4350-4354.
14. Hancock K, Tsang VCW. Indian ink staining of proteins on nitrocellulose paper. Anal Biochem 1983;133:157-162.

Fe de erratas:
Artículo publicado con correcciones.
Publicación original:
Rev Sanid Milit Méx 1995; Vol. 49, Núm. 6 pp 155-160