

Tesis Doctoral

Desarrollo de un ensayo competitivo para la detección de endotoxinas

Pallarola, Diego Andrés

2008

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pallarola, Diego Andrés. (2008). Desarrollo de un ensayo competitivo para la detección de endotoxinas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pallarola, Diego Andrés. "Desarrollo de un ensayo competitivo para la detección de endotoxinas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

DESARROLLO DE UN ENSAYO COMPETITIVO PARA LA DETECCIÓN DE ENDOTOXINAS

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Inorgánica, Analítica y Química Física

Diego Andrés Pallarola

Director de tesis: Fernando Battaglini

Consejero de estudios: Ernesto Julio Calvo

Buenos Aires, 2008

Desarrollo de un Ensayo Competitivo para la Detección de Endotoxinas

La sepsis y el shock séptico son serias causas de muerte. Estas condiciones pueden iniciarse por una liberación masiva de lipopolisacárido (LPS) proveniente de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, el cual activa en forma inapropiada el sistema inmune innato. Actualmente, el ensayo enzimático del lisado de amebocitos del *Limulus Polyphemus* (LAL) se utiliza ampliamente en la detección y cuantificación de endotoxinas en muestras clínicas y no clínicas. Sin embargo, este procedimiento posee varias limitaciones.

El LPS está organizado en tres dominios estructurales, un heteropolisacárido que representa la superficie antigénica de la bacteria llamado antígeno O, una porción central constituido por un oligosacárido, denominado núcleo sacárido y una porción lipídica llamada lípido A, responsable de la actividad endotóxica del LPS. Debido a las propiedades químicas del LPS, el estudio de sus rutas metabólicas, su interacción con moléculas de reconocimiento o superficies modificadas, se realiza empleando LPS marcado. Por otra parte, dada su tendencia a formar agregados, su derivatización con técnicas comúnmente utilizadas en polisacáridos rinde resultados pobres y pérdida de su actividad endotóxica.

En el presente trabajo de tesis se estudiaron distintas estrategias para la síntesis de conjugados de LPS de *Salmonella Minnesota*. La derivatización de LPS se llevó a cabo en la región polisacárida lejos del lípido A. Se han sintetizado conjugados con diversas sondas incluyendo, dansilo, biotina, peroxidasa de rábano picante (HRP) y complejos electroactivos. Los conjugados con biotina y HRP se utilizaron en el desarrollo de ensayos competitivos amperométricos para la detección de endotoxinas.

La configuración de los ensayos involucra una superficie de oro modificada con un derivado del dextrano y como elemento de reconocimiento una proteína recombinante, *Endotoxin Neutralizing Protein* (ENP), que reconoce específicamente la región del lípido A del LPS. Para estos ensayos se ha estudiado la modificación de la superficie de oro con polímeros hidrofílicos con el objetivo de minimizar la interacción inespecífica de los componentes del ensayo con la superficie. La construcción de los electrodos se evaluó por medidas electroquímicas, elipsometría y espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS). Con el sistema utilizando el conjugado de LPS-HRP se alcanzó un límite de detección de $0,06 \text{ UE mL}^{-1}$.

Palabras clave: Lipopolisacáridos, endotoxinas, conjugación, fluoróforo, enzima, adsorción, ensayo amperométrico, ensayo competitivo.

Development of a Competitive Assay for the Detection of Endotoxins

Sepsis and septic shock are major causes of death. These conditions can be initiated by the massive release of lipopolysaccharide (LPS) from the cell wall of Gram-negative bacteria, which then inappropriately activates the innate immune system. Currently, the enzymatic *Limulus Polyphemus* amebocyte lysate (LAL) assay is used most widely to detect and quantify endotoxin in clinical and nonclinical samples. However, there are several limitations to this procedure.

LPS is organized in three structural domains, a heteropolysaccharide which represents the antigenic surface of the bacteria called O-antigen, a short oligosaccharide, which is the core region and a fatty-acylated region called lipid A, which is the active moiety of LPS. Because of the chemical properties of LPS, studies of its biological pathways, its interactions with recognition molecules, and its interactions with modified surfaces are carried out mainly using labeled LPS. In contrast, because its ability to form aggregates, the modification of LPS using polysaccharides common labeling protocols gives poor yields and endotoxic activity loss.

In this thesis work, different strategies were studied for the synthesis of *Salmonella Minnesota* LPS conjugates. The LPS labeling were carried out in the polysaccharide region, away from lipid A. We have synthesized conjugates with different probes including, dansyl, biotin, horseradish peroxidase (HRP) and electroactive complexes. The biotin and HRP derivatives were used in the development of competitive electrochemical assays for the detection of endotoxins.

The assay configuration involves a dextran-derivative modified gold surface and a recombinant protein, Endotoxin Neutralizing Protein (ENP), as the recognition element, which specifically recognizes the LPS lipid A portion. For these assays, we have studied the gold surface modification with hydrophilic polymers with the objective of reducing the nonspecific interaction of the assay components with the surface. The construction of the electrodes was evaluated by electrochemical and ellipsometric measurements and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The device using the LPS-HRP conjugate was able to detect the presence of endotoxins in concentrations as low as 0.06 EU mL^{-1} .

Keywords: Lipopolysaccharides, endotoxins, labeling, fluorophore, enzyme, adsorption, amperometric assay, competitive assay.

Agradecimientos

A Doris, por estar siempre a mi lado, por darme paz en los momentos tensos, por hacer más alegres los momentos buenos, por enseñarme a ser más paciente, por compartir mi ansiedad, por amarme tanto, por todo mi Vida.

A mi hermosa Familia por su apoyo incondicional. A Papá Marcelo y Mamá Graciela, a la Abuela María, a mis Hermanos Gastón y Ana, y a mi Madrina “la Tía Mary”.

A mis Amigos de Toda la Vida por darme la dicha de su amistad desde tantos años. Fedu, Patito, Seba, El Negro, Sebita, Paty y Truck (volveré).

A mis Amigos del Huergo por tantos momentos lindos y por una amistad invaluable. A Pablito, Tati, Johnny y Nico (volveré?).

A Anita por ser una amiga de fierro durante tantos años.

A mis Amigos de la Facultad por ser mi cable a tierra en tantas cosas. A Euge, Sole, Pablo H., Silvia y Lore. Silvia gracias por hacer este cuatrimestre de docencia más llevadero. Panita a vos te reservo un lugar aparte porque sos muy grandote, de corazón.

A Fernando (director, jefe, mentor) por darme la oportunidad y el sostén para trabajar en este proyecto, por estar presente (cuando la dirección del departamento no se interpone) para la discusión y por ayudarme a ver que de vez en cuando las cosas no son tan terribles como parecen.

Al CONICET y a Fresenius Medical Care Argentina, en particular al Dr. Yagupsky, por confiar y financiar este proyecto.

Al DQIAyQF-INQUIMAE (FCEyN-UBA) por brindarme el lugar y el apoyo para llevar a cabo mi tesis doctoral.

A todos los que son y fueron parte del grupo de Laboratorio por estar siempre dispuestos a ayudar y por el buen ambiente laboral. Graciela G., Jorge AKA “El Pana”, Lore, Mauricio, Ana Sol, Sofia, Vanesa, Ana Florencia, y particularmente a Graciela P. por su guía en la primer etapa del doctorado.

Al Dr. Ernesto Calvo por ser mi consejero de estudios y por el buen asado.

A los Pibes del Huergo que me acompañaron en mis primeros pasos “Rumbo al Doctorado” y por darle al camino un gusto que no se olvidará jamás. Pablito, Tati, Johnny, Nico (again), Pani, Ricky, Tommy y Neti.

A “El Profe del Huergo”, Luis M. Costa por su incesante persuasión al estudio.

A Paula y Andrea por compartir la carrera de grado, el frenesí del doctorado y porque siempre es lindo volvernos a encontrar.

A las secretarias del DQIAyQF por la buena onda y predisposición. Ale y Claudia.

A todos los que forman parte del DQIAyQF-INQUIMAE porque somos una gran familia disfuncional pero carismática (los que se sientan aludidos).

Al Dr. Roberto Salvarezza, Dr. Benitez y Dr. Rubert por las medidas de XPS, y a la Dra. Grumelli por convencerlos y/o persuadirlos de que las hagan.

Y finalmente, pero no menos importante, a Andrés Pal por ser tal cual sos.

*A mis Padres y
a la Abuela María*

Los resultados que se presentan en este trabajo de tesis han sido parcialmente publicados en:

Publicaciones

Priano G., Pallarola D., Battaglini F. Endotoxin Detection in a Competitive Electrochemical Assay. The Use of a Biotin-Lipopolysaccharide Conjugate *Analytical Biochemistry* **362**, (2007) 108–116.

Pallarola D., Domenianni L., Priano G., Battaglini F. A Protein-Resistant Matrix for Electrochemical Based Recognition Assays *Electroanalysis* **19**, 6 (2007) 690–697.

Pallarola D., Battaglini F. An Efficient Method for the Conjugation of a Lipopolysaccharide from *Salmonella enterica* sv. Minnesota with Probes Bearing Hydrazine or Amino Functional Groups *Analytical Biochemistry* **381**, (2008) 53–58.

Pallarola D., Battaglini F. Efficient Conjugation of a Lipopolysaccharide and its Use in a Highly Sensitive Biosensor Based in a Competitive Assay *En preparación*, Noviembre (2008).

Patente

Battaglini F., Pallarola D. Conjugados de Lipopolisácaridos y Procedimientos de Síntesis. Acta N° P 08 0101135, n/ref.: C. 14.705. 19 de Marzo del 2008.

Capítulo 1 – Introducción

1.1	Endotoxinas	3
1.1.1	Estructura química	4
1.1.2	Estructura supramolecular	6
1.1.3	Acción fisiológica	8
1.1.4	Unidad de endotoxina estándar	10
1.1.5	Ensayo de endotoxinas bacterianas. Ensayo LAL	10
1.1.6	Moléculas de unión a LPS	12
1.1.6.1	Anticuerpos antiendotoxinas	13
1.1.6.2	Proteínas de granulocitos de unión a LPS	13
1.1.6.2.1	Proteína que aumenta la permeabilidad bactericida (BPI)	14
1.1.6.2.2	Proteínas antimicrobianas catiónicas (CAP)	14
1.1.6.2.3	Lisozima (LZM)	15
1.1.6.2.4	Lactoferrina (LF)	15
1.1.6.2.5	Catepsina G	15
1.1.6.3	Otras moléculas de unión a LPS	16
1.1.6.3.1	Proteína de unión a LPS (LBP)	16
1.1.6.3.2	Factor <i>Limulus</i> anti-LPS (LALF o ENP)	16
1.1.6.3.3	Factor C	18
1.1.6.3.4	Polimixina B (PmB)	18
1.2	Selectividad química y reconocimiento molecular	19
1.2.1	Inmunoensayos	20
1.2.1.1	Ensayo inmunométrico	21
1.2.1.2	Ensayo competitivo	22
1.2.2	Ensayos de reconocimiento no inmunológicos	23
1.3	Transducción electroquímica	24
1.4	Peroxidasa de rábano picante isoenzima C (HRP-C)	26
1.4.1	Actividad catalítica	27
1.5	Antecedentes	28
1.5.1	Sistemas de detección de endotoxinas	28
1.5.2	Síntesis de conjugados de LPS	32
1.6	Objetivos	33

Capítulo 2 – Técnicas Empleadas

2.1	Introducción	37
2.2	Técnicas electroquímicas	37
2.2.1	Conceptos generales	37
2.2.1.1	Celda electroquímica	38
2.2.1.2	Potenciostato	38
2.2.2	Cronoamperometría	39
2.2.3	Voltametría cíclica	41
2.2.3.1	Especie electroquímica en solución	42
2.2.4	Voltametría diferencial de pulso	44
2.2.5	Reacción catalítica acoplada	47
2.3	Espectrometría de desorción/ionización por láser asistida por una matriz	49
2.4	Ensayos competitivos	53
2.4.1	Curva de competencia	53
2.4.2	Unión inespecífica	55
2.5	Instrumentación	55
2.5.1	Técnicas electroquímicas	55
2.5.2	Espectrometría de desorción/ionización por láser asistida por una matriz	58

Capítulo 3 – Materiales y Métodos

3.1	Introducción	61
3.2	Purificación y caracterización de lipopolisacárido	61
3.2.1	Introducción	61
3.2.2	Experimental	62
3.2.2.1	Reactivos	62
3.2.2.2	Cromatografía de exclusión por tamaño	63
3.2.2.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS	65
3.2.3	Resultados	66
3.2.4	Sumario	70
3.3	Síntesis de carboximetildextrán70 (CMDex70)	71
3.4	Determinación electroquímica del coeficiente de difusión del mediador [Os(bpy) ₂ pyCl]PF ₆	73

3.4.1	Experimental	73
3.4.2	Resultados	73
3.5	Caracterización de conjugados de LPS	75
3.5.1	Determinación de la concentración de dansilo por espectroscopía de fluorescencia	76
3.5.2	Análisis de HRP y sus derivados por espectrometría MALDI-TOF	76
3.5.3	Actividad enzimática de HRP	78
3.5.4	Determinación de la concentración de HRP	78
3.5.4.1	Espectroscopía de absorción molecular	78
3.5.4.2	Ensayo colorimétrico	78
3.6	Construcción de la plataforma multielectrodos	79
3.6.1	Limpieza y caracterización de los electrodos de oro	79

Capítulo 4 – Matriz para Ensayos de Reconocimiento Molecular

4.1	Introducción	85
4.2	Experimental	87
4.2.1	Reactivos	87
4.2.2	Construcción de electrodos modificados	88
4.2.2.1	Adsorción de tiol (Au/Cys y Au/MPA)	88
4.2.2.2	Modificación con carboximetildextrán (Au/Cys/CMDex)	88
4.2.2.3	Modificación con aminodextrán (Au/MPA/NH ₂ Dex)	89
4.2.2.4	Modificación con PEG400 y PEG174 (Au/Cys/CMDex/PEG400 y Au/Cys/CMDex/PEG174)	89
4.2.2.5	Modificación con PEG5000 (Au/Cys/CMDex/PEG5000)	90
4.2.2.6	Modificación de electrodos con biotina (Au/Cys/CMDex/biot y Au/Cys/CMDex/PEG5000/biot)	90
4.2.2.7	Adsorción de N-HRP	90
4.2.3	Síntesis de carboximetildextrán-biotina (CMDex24-biotina)	91
4.2.4	Mediciones electroquímicas	92
4.2.4.1	Desorción reductiva de cistamina	92
4.2.4.2	Mediciones cronoamperométricas	92
4.2.5	Mediciones elipsométricas	93
4.2.6	Ángulo de contacto	93
4.3	Resultados	93

4.4	Sumario	105
-----	---------	-----

Capítulo 5 – Conjugados de LPS: Oxidación con Periodato

5.1	Introducción	109
5.2	Experimental	110
5.2.1	Reactivos	110
5.2.2	Síntesis de conjugados de LPS con dansilo y biotina	110
5.2.2.1	Método enzimático	111
5.2.2.2	Oxidación con periodato de sodio	111
5.2.3	Síntesis de conjugados de LPS con complejos electroactivos	112
5.2.3.1	Síntesis de LPS- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{py}]^{2+}$	112
5.2.3.2	Síntesis de LPS- $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{py})\text{Cl}]^{2+}$	113
5.3	Resultados	113
5.3.1	Método enzimático	113
5.3.2	Oxidación con periodato de sodio	115
5.3.3	Síntesis de LPS- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{py}]^{2+}$	119
5.4	Sumario	122

Capítulo 6 – Conjugados de LPS: Activación con BrCN

6.1	Introducción	127
6.2	Experimental	128
6.2.1	Reactivos	128
6.2.2	Síntesis del conjugado LPS-dansilo	128
6.2.3	Síntesis del conjugado LPS-HRP	129
6.2.4	Modificación de HRP con FMOC-PEG-COOH	130
6.2.5	Conjugación de LPS con PEG-HRP	131
6.2.5.1	Purificación cromatográfica del conjugado LPS-PEG-HRP	131
6.3	Resultados	132
6.3.1	Conjugado LPS-dansilo	132
6.3.2	Conjugado LPS-PEG-HRP	135
6.4	Actividad enzimática de HRP. Medios para su conservación y almacenamiento	143

6.5	Sumario	145
-----	---------	-----

Capítulo 7 – Conjugados de LPS: Activación con CDAP

7.1	Introducción	149
7.2	Experimental	150
7.2.1	Reactivos	150
7.2.2	Síntesis del conjugado LPS-dansilo	150
7.2.3	Síntesis del conjugado LPS-dansilo empleando compuestos anfifílicos	150
7.2.4	Síntesis del conjugado LPS-PEG-dHRP	151
7.2.4.1	Deglicolisación de la peroxidasa de rábano picante	151
7.2.4.2	Modificación de dHRP con DAPEG	151
7.2.4.3	Cuantificación de grupos aminos primarios en dHRP-PEG-NH ₂	152
7.2.4.3.1	Modificación de dHRP-PEG-NH ₂ con ferrocenoaldehído	152
7.2.4.3.2	Análisis por voltametría diferencial de pulso de dHRP-PEG-Fc	152
7.2.4.4	Conjugación de LPS con dHRP-PEG-NH ₂	153
7.2.4.5	Purificación cromatográfica del conjugado LPS-PEG-HRP	153
7.3	Resultados	154
7.3.1	Conjugado LPS-dansilo	154
7.3.2	Conjugado LPS-PEG-HRP	158
7.4	Sumario	169

Capítulo 8 – Ensayo Competitivo

8.1	Introducción	173
8.2	Experimental	175
8.2.1	Reactivos	175
8.2.2	Construcción de electrodos modificados	175
8.2.2.1	Modificación con la proteína de reconocimiento ENP (Au/Cys/CMDex/ENP)	176

8.2.3	Análisis de los electrodos modificados por espectroscopia fotoelectrónica de rayos X	176
8.2.4	Adsorción de LPS-PEG-HRP	177
8.2.5	Ensayo competitivo	177
8.2.6	Mediciones cronoamperométricas	178
8.3	Resultados	179
8.3.1	Seguimiento de la construcción de los electrodos modificados	179
8.3.2	Adsorción de LPS-PEG-HRP	183
8.3.3	Ensayo competitivo	186
8.4	Sumario	189

Capítulo 9 – Discusión y Conclusiones

9.1	Conjugados de LPS	193
9.2	Ensayos para la detección de endotoxinas	198
9.3	Conclusiones	204

Referencias

Capítulo *1*

Introducción



1.1 – Endotoxinas

Las bacterias Gram-negativas se hallan protegidas de su entorno por una membrana externa asimétrica que encapsula su peptidoglicano. La sección externa de esta membrana se compone principalmente de lipopolisacárido (LPS), un glicolípido que constituye el mayor componente superficial de las bacterias Gram-negativas, mientras que la sección interna se compone por fosfolípidos [1]. El LPS, también denominado endotoxina está organizado en tres dominios estructurales, antígeno O, núcleo sacárido (denominado en inglés *core*) y lípido A [2].

Una única célula de *Escherichia Coli* contiene aproximadamente $3,5 \times 10^6$ moléculas de LPS [3]. Estas moléculas están ancladas en la membrana externa de la célula, como puede observarse en la Figura 1.1, y son liberadas continuamente al medio circundante de las células bacterianas en la etapa de replicación y también cuando la bacteria muere o se lisa. Son moléculas muy estables, resisten temperaturas extremas (180-220 °C) y medios muy ácidos ó básicos (pH 3-12), en comparación con proteínas. Debido a su tamaño, pueden atravesar las membranas de los filtros de esterilización de fluidos (0.1-0.22 μm).

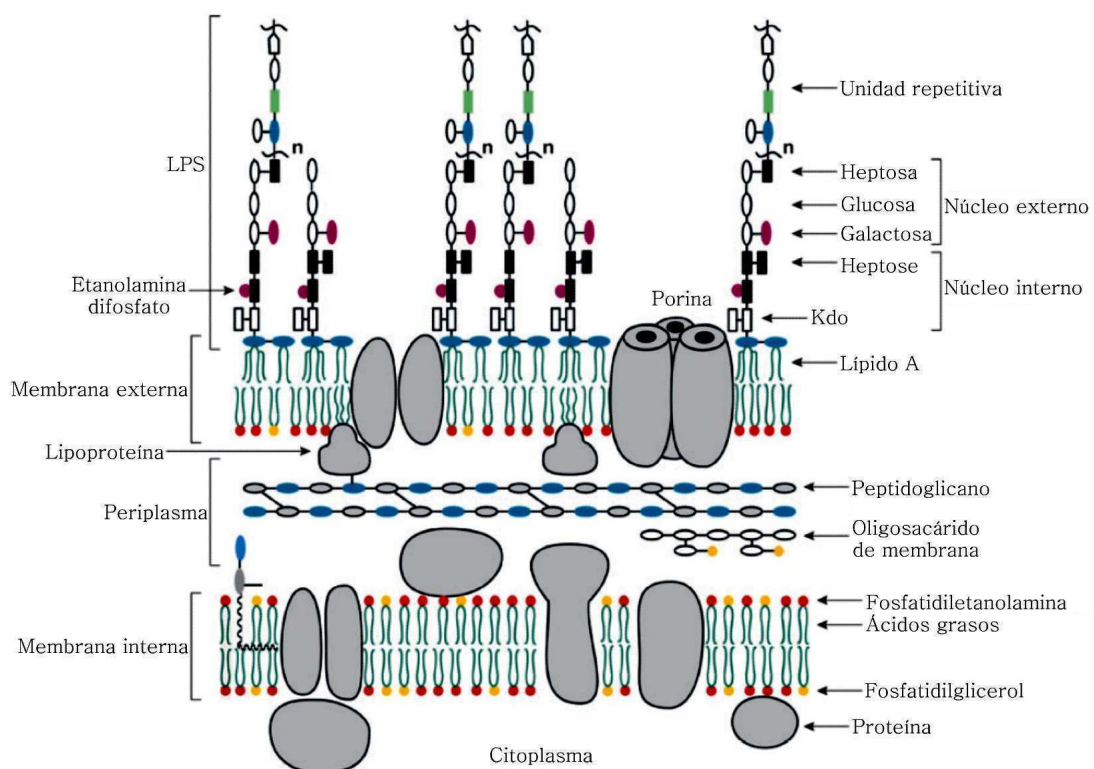


Figura 1.1: Estructura esquemática de la cubierta de una célula de *E. Coli* K-12 [4].

1.1.1 – Estructura química

El lipopolisacárido posee una región polisacárida y una región lipídica. Su estructura fue elucidada en la década del 80 por diferentes grupos de investigación. Consiste en tres regiones diferentes desde el punto de vista químico. En la Figura 1.2 A se presenta un esquema de la estructura química de un LPS completo (liso) y en la Figura 1.2 B, la estructura química para el LPS de los distintos mutantes de *Salmonella minnesota*. Como ya se ha mencionado el LPS está constituido por una porción lipídica no polar llamada lípido A, una porción central constituida por un oligosacárido, denominado núcleo sacárido y un heteropolisacárido que representa la superficie antigénica de la bacteria, llamado antígeno O.

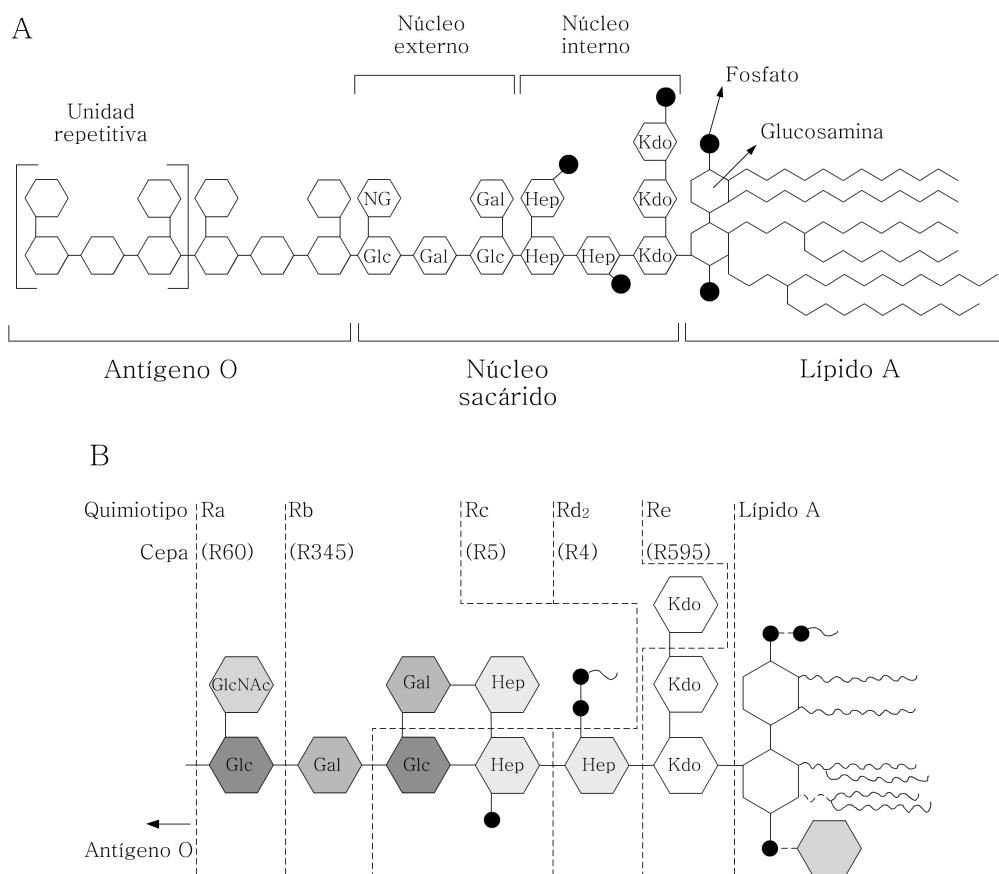


Figura 1.2: Estructura esquemática de LPS. A) LPS completo (liso). B) LPS proveniente de mutantes de *Salmonella Minnesota* [5].

Todas las bacterias Gram-negativas, con la excepción de algunas que producen esfingolípidos en lugar de LPS, sintetizan el lípido A mediante caminos metabólicos similares al de *E. Coli* [4]. El lípido A es un anfífilo formado por un disacárido de

glucosamina difosforilado, por lo tanto, hidrofílico y negativamente cargado, unido a un dominio hidrofóbico de 6-7 cadenas con 12-16 carbonos cada una, vía un enlace amida o éster [6-8]. La región hidrofóbica adopta una estructura hexagonal, resultando en una estructura más rígida comparada con el resto de la molécula. La Figura 1.3 muestra la estructura química del lípido A para *Salmonella* y *E. Coli*. El lípido A actúa como un anclaje hidrofóbico para el LPS y es el componente bioactivo de la molécula asociada con el shock séptico generado por bacterias Gram-negativas [2, 9-11].

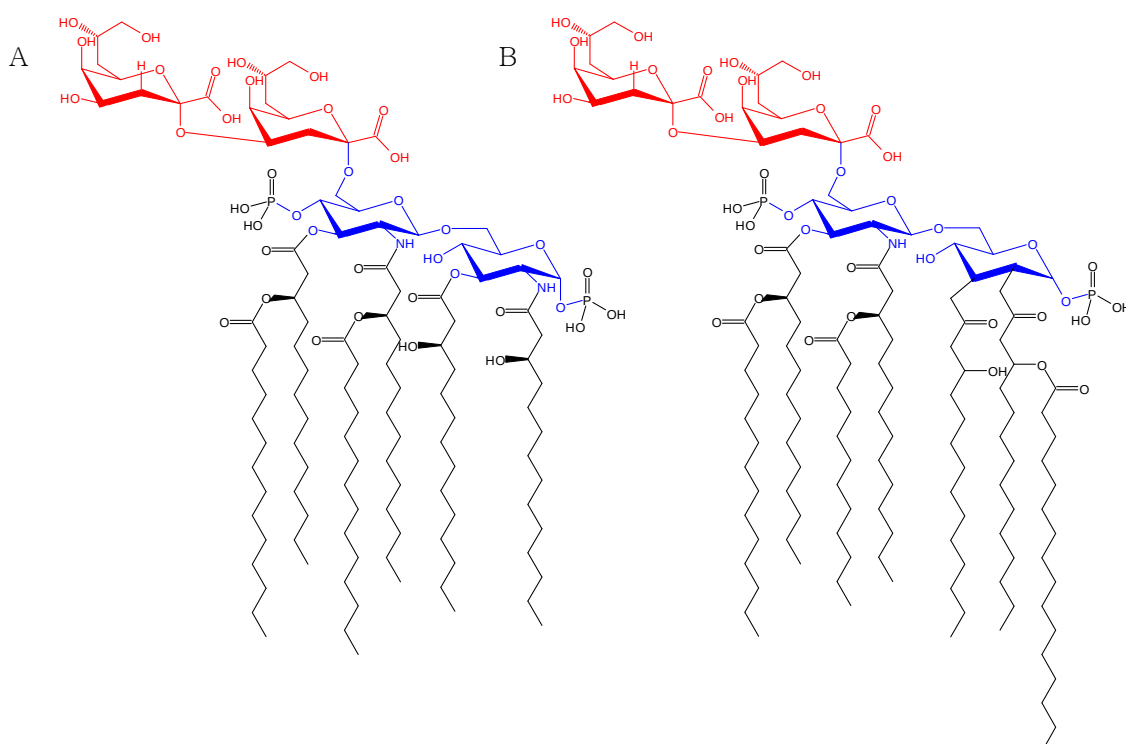


Figura 1.3: Estructura química de Kdo₂-lípid A de A) *E. Coli* y B) *Salmonella*.

La zona central de la molécula, el núcleo sacárido, está compuesta por hidratos de carbono presentando una estructura poco variable entre las distintas especies. La misma puede dividirse en dos regiones: una región interior y otra exterior. La región interior, denominada núcleo interno (*inner core*) y vecina al lípido A, está formada por heptosas y ácido 3-desoxi-D-*mano*-2-octoulosónico (Kdo). Al igual que el lípido A, se encuentra parcialmente fosforilada, por lo que las endotoxinas exhiben una carga neta negativa en solución a pH fisiológico [12]. La región exterior, denominada núcleo externo (*outer core*), está formada por hexosas y aminohexosas y presenta mayor diversidad entre lipopolisacáridos de distintos orígenes.

El antígeno O está formado por una cadena de unidades repetitivas de un oligosacárido (3 a 8 monosacáridos), específicos y determinantes de la identidad serológica de la bacteria. Ésta es la porción más variable entre distintas especies y aún dentro de la misma especie. Puede cambiar el tipo de azúcar de una especie a otra o de un serotipo a otro y también puede cambiar el número de unidades repetidas dentro de una misma especie y serotipo, por lo que las muestras son altamente heterogéneas. Una descripción detallada sobre la estructura y biosíntesis del núcleo sacárido y el antígeno O puede encontrarse en las referencias [2, 13]. La masa molar de un monómero de endotoxina es de alrededor de 10 kDa, aunque también se ha llegado a estimar entre 15–20 kDa, dependiendo de la variabilidad del antígeno O [12, 14].

1.1.2 – Estructura supramolecular

Las endotoxinas son moléculas anfifílicas, y por lo tanto tienden a formar agregados multiméricos (Figura 1.4) por encima de una concentración de agregación crítica (CAC), también denominada concentración micelar crítica (CMC), que depende de su hidrofobicidad. Por encima de esa concentración, existe un equilibrio entre los monómeros libres y los agregados. La CMC es influenciada por la cantidad de azúcares unidos a la porción de lípido A, así como por el número y distribución de las cargas. De esta forma, la CMC es mayor para LPS liso que para LPS proveniente de cepas mutantes, dada su elevada cantidad de azúcares en la región del antígeno O [15].

La estructura de los agregados formados por encima de la CMC puede ser tanto nomenclatura invertida (cúbica, Q, o hexagonal, H_{II}) o lamelar, dependiendo de la conformación de las moléculas que contribuyen al agregado [16]. Por otro lado, la agregación y la estructura que adopta el LPS se ve influenciada por la presencia de contraiones divalentes [17], dada su influencia sobre las cadenas acílicas y la movilidad de las cabezas hidrofílicas del LPS [18, 19]. En particular, el Ca²⁺, Mg²⁺ y en menor magnitud el Ba²⁺ modifican los parámetros biofísicos tales como el orden de las cadenas acílicas y la estructura de agregación [20].

Los monómeros de LPS, pueden obtenerse por encima de la CMC mediante el uso de tensioactivos tales como triton X-100 [21], ácidos biliares o cólicos como el deoxicolato [22], quelantes como el EDTA [23] y también por sonificado.

Las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos en general, asumen 2 estados ó fases principalmente, el gel (β) y el líquido cristalino (α). La transición entre las distintas fases está acompañada por cambios en la geometría de las moléculas

involucradas y por lo tanto tiene también un impacto en la estructura del ensamblado supramolecular [24]. El cambio reversible entre dichas fases puede inducirse con la temperatura. Dicha temperatura, la temperatura de transición o temperatura crítica (T_c), depende del tipo de cabeza hidrofílica (tamaño y carga) y del número, longitud y grado de saturación de las cadenas hidrocarbonadas hidrofóbicas.

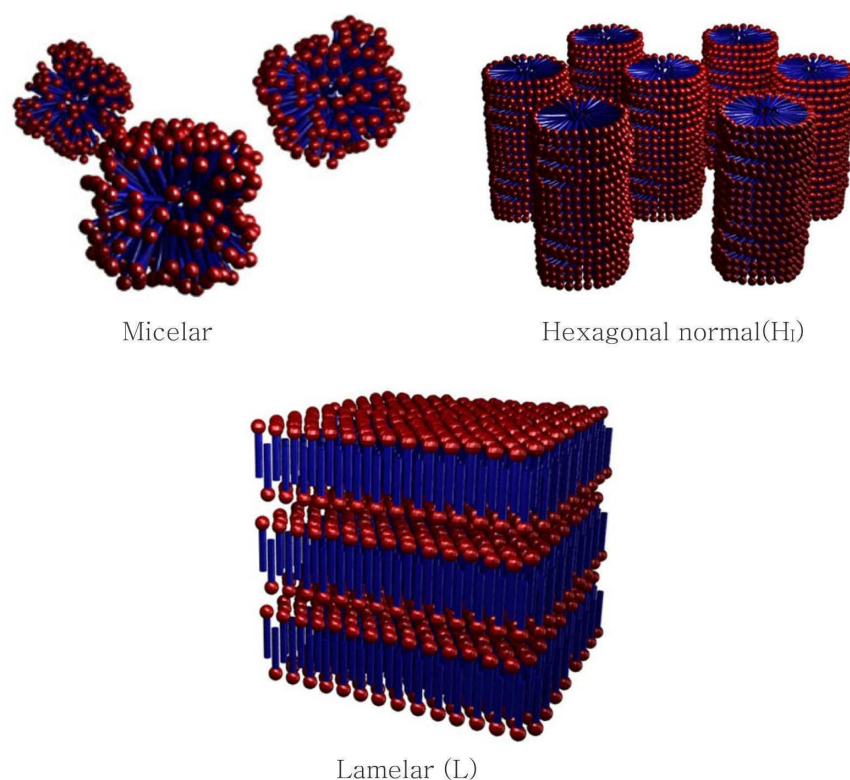


Figura 1.4: Algunas de las estructuras supramoleculares del LPS. La región polar de la molécula está representada con una esfera roja y la región hidrofóbica con un bastón azul.

Para el caso de LPS y lípido A, debe considerarse la variación en la estructura química primaria, por ejemplo variaciones en la conformación y estado de carga de la cabeza hidrofílica, en el patrón de acilación y en la longitud de la cadena de carbohidratos, aún dentro de la misma preparación, por lo tanto los valores macroscópicos medidos corresponden a un promedio de una mezcla microscópicamente heterogénea. Esto representa el principal impedimento para el estudio de las propiedades fisicoquímicas del LPS [22], pudiéndose encontrar resultados parcialmente contradictorios en la literatura, tanto sobre estructura como sobre su comportamiento. Para más detalles acerca de parámetros fisicoquímicos y estructura tridimensional de LPS y Lípido A pueden consultarse las referencias [17, 25–29].

El conocimiento del valor de la concentración a partir de la cual el LPS comienza a formar agregados es fundamental para el desarrollo de ensayos para su detección, así como para su caracterización y la de sus derivados. En varias publicaciones se han presentado estudios que permitieron estimar el valor de CMC para LPS de distintas cepas bacterianas [30–33], así como la masa molecular de sus monómeros.

1.1.3 – Acción fisiológica

Cuando un organismo reconoce a un potencial patógeno como extraño, un eficiente sistema de alerta dispara la respuesta inmune. Este mecanismo es activado para destruir al agente invasor, pero también puede, si es sobreestimulado iniciar una cascada de eventos fisiopatológicos denominado shock séptico.

Cuando las endotoxinas se administran en forma intravenosa producen un efecto similar al del inicio de la sepsis y por esta razón se han utilizado ampliamente como modelo en humanos y animales para estudiar el mecanismo de la sepsis [34]. Los esfuerzos actuales en su investigación se deben a la predominancia de su ocurrencia y la mortalidad asociada. Se estima que se producen, solo en los Estados Unidos, alrededor de 500000 casos por año, de los cuales el 35% de esos pacientes no se recuperan [35].

La sepsis se ha definido como la “respuesta sistémica a la infección” [36], donde la bacteremia, endotoxemia, fungemia, y viremia más específicamente representan la presencia de bacterias viables, endotoxinas, hongos, y virus, respectivamente, en la sangre. El shock séptico es el resultado final de la sepsis y se ha definido como “un estado de perfusión tisular inadecuada inducida por productos microbianos y caracterizada por baja presión sanguínea y señales bioquímicas asociadas al déficit de oxígeno” [37]. La respuesta inflamatoria intravascular generalizada causa la reducción de oxígeno y de la capacidad de transporte de nutrientes a los órganos vitales resultando en vasodilatación.

La introducción de componentes bacterianos a la circulación sanguínea es causada por infecciones, frecuentemente infecciones hospitalarias, debido al uso excesivo de catéteres y otros dispositivos invasivos. Esto ocurre generalmente en pacientes inmunodeprimidos por quimioterapias, por transplantes, con enfermedades inflamatorias como así también en pacientes bajo tratamiento por quemaduras o traumas severos.

La respuesta del organismo a la presencia de endotoxinas (Figura 1.5) en el torrente sanguíneo activa dos líneas de defensa del sistema inmune: una línea humoral (comprendida por el complemento, anticuerpos y proteínas de fase aguda) y una línea celular, en particular de células mononucleares (monocitos y macrófagos) y neutrófilos.

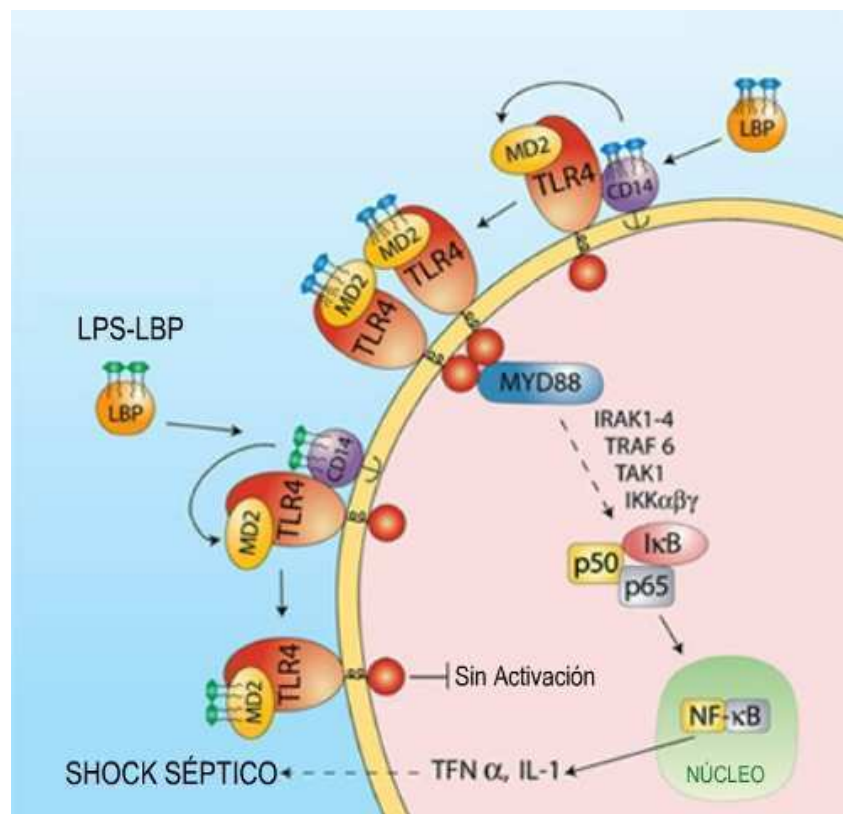


Figura 1.5: Cascada de eventos asociada con el shock séptico [38].

La respuesta sensible del sistema inmune al LPS requiere al menos de dos elementos bioquímicos: una proteína que lo reconoce, proteína de unión a LPS (LBP, del inglés LPS-binding protein) [8, 39-42] y un receptor celular conocido como CD14 [43, 44]. La proteína de unión a LPS se produce y secreta por el hígado y se acumula en plasma en concentraciones 100 veces mayores que lo normal al iniciarse la respuesta inmune inducida por la presencia de LPS. Otro componente de la membrana celular, el TLR2, actúa como co-receptor e inductor de la producción de citoquinas. La activación generalizada de células del sistema inmune en respuesta a LPS resulta en la liberación desmedida de mediadores de la respuesta inflamatoria: citoquinas (TNF-α, IL-1 e IL-6), prostaglandinas, interleuquinas y especies oxigenadas reactivas. Estos compuestos inducen vasodilatación y sobrerregulación de moléculas de adhesión, resultando en la liberación desmesurada de neutrófilos y monocitos y en la activación de linfocitos,

leucocitos y células del endotelio. Las citoquinas son los mediadores primarios de la cascada de eventos que ocurren luego de la endotoxemia. Mediadores secundarios, tales como prostaglandinas y leucotrienos liberados por los neutrófilos y óxido nítrico producido en grandes cantidades por monocitos y macrófagos, juegan también un importante rol debido a su potente acción local sobre la microvasculatura. Algunos vasos sanguíneos se contraen mientras que otros se dilatan resultando en una anormal distribución del flujo sanguíneo. Además de la estimulación de la coagulación por citoquinas, el LPS interacciona directamente con el sistema de coagulación activando la cascada de complemento y modificando varias etapas del sistema de coagulación. El cuadro clínico resultante se denomina Coagulación Intravascular Diseminada (DIC).

La producción desmedida de citoquinas induce alteraciones metabólicas, hormonales y neuroendocrinológicas, que sumado a la anormal distribución del flujo sanguíneo, produce la disfunción de las células y la falla progresiva de distintos órganos importantes tales como el cerebro, corazón, riñón, hígado y pulmón dando lugar a cuadros clínicos severos como el Síndrome de Falla Multiorgánico (MOF) y el Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (ARDS).

1.1.4 – Unidad de endotoxina estándar

Debido a que igual masa de cualesquiera dos endotoxinas provenientes de distintas bacterias o cepas, o aún de diferentes métodos de extracción, no necesariamente poseen igual potencia en cuanto a su actividad biológica se refiere, es necesario establecer una endotoxina estándar de referencia cuya potencia sea conocida en relación a sus efectos en humanos. Se establece entonces la UE (unidad de endotoxina), como la actividad de una endotoxina específica (EC-2) [45], definida como la quinta parte de la cantidad de endotoxina de *E. Coli* (EC-2) requerida para generar una respuesta pirogénica cuando es inyectada en humanos y conejos, sobre la base de su peso expresado en kg. La UE establecida y definida como 0,2 ng de EC-2 expresa la actividad biológica de cualquier solución en términos de su similitud con la potencia pirogénica de *E. Coli*.

1.1.5 – Ensayo de endotoxinas bacterianas. Ensayo LAL

La utilización del LAL (Lisado de Amebocitos del *Limulus Polyphemus*) para la detección de endotoxinas surgió de los estudios de Bang [46], al observar un cuadro de

coagulación intravascular fatal en el cangrejo herradura, *Limulus Polyphemus*, bajo la infección por bacterias Gram-negativas. Luego, Levin y Bang [47, 48] demostraron que la coagulación era el resultado de la reacción entre la endotoxina y una proteína coagulable en los amebocitos del *Limulus*. Seguido del desarrollo de un agente anticoagulante para la sangre del *Limulus*, Levin y Bang [49] prepararon un lisado a partir de amebocitos que presentaba una elevada sensibilidad frente a la presencia de endotoxinas. Solum [50, 51], Young, Levin y Prendergast [52] demostraron que la reacción involucrada entre la endotoxina y la proteína coagulable era enzimática. La endotoxina cataliza la activación de una proenzima en el lisado de los amebocitos del *Limulus*. La enzima activada (coagulasa) hidroliza enlaces específicos dentro de la proteína coagulable (coagulígeno) presente en el lisado. Una vez hidrolizada, la resultante coagulina se asocia y da lugar a un gel. Este hecho dio origen al método de determinación LAL de gel en tubo y el ensayo LAL turbidimétrico (Figura 1.6) [53, 54].

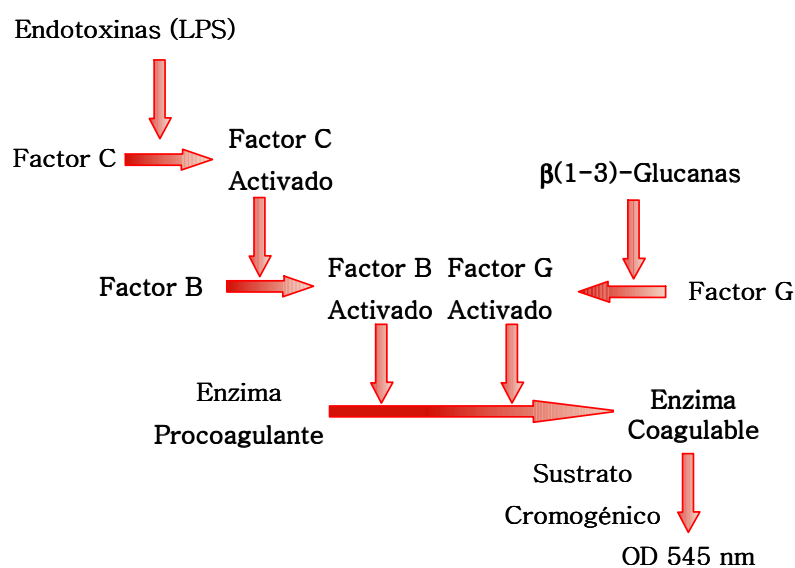


Figura 1.6: Reacción de coagulación en cascada en el lisado de amebocitos del cangrejo herradura. El Factor C, Factor B, Factor G y la Enzima Coagulable son componentes del lisado de amebocitos.

Basado en este mismo principio se desarrolló un método cromogénico [55] donde se agrega un sustrato peptídico cromogénico incoloro que reacciona con el coagulígeno durante la cascada de coagulación del lisado en presencia de LPS. El sustrato cromogénico, en su reacción con el coagulígeno libera p-nitroanilina de color amarillo, pudiéndose medir su absorbancia a 405 nm. Tanto el método turbidimétrico

como el cromogénico permiten estimaciones cuantitativas, mientras que el método de gel en tubo se emplea como ensayo límite o semicuantitativo.

El método tiene una importante variabilidad, requiere ensayos de confirmación de sensibilidad del lisado y de inhibición o intensificación. Por otra parte es costoso, no solo por el requerimiento de personal entrenado para la realización del ensayo, sino también debido a los pasos que se requieren para la preparación del reactivo, que involucra desde la captura del cangrejo hasta la purificación del lisado.

La principal ventaja del método es su alta sensibilidad y bajo límite de detección. Los proveedores aseguran que valores tan bajos como 0,03, 0,005 y 0,001 UE mL⁻¹ pueden detectarse con el método de gel en tubo, el cromogénico y el turbidimétrico, respectivamente, aunque no recomiendan el uso de concentraciones menores a 0,01 UE mL⁻¹ en la curva de calibración [56–58].

El ensayo LAL está aprobado por la Federal Drug Administration (FDA) para la determinación de endotoxinas en baños de diálisis, inyectables, sueros y dispositivos médicos. Sin embargo, dada su variabilidad, recomienda ante resultados dudosos, la realización del ensayo en conejos, donde la administración de endotoxinas en sangre da lugar a un cuadro febril [59].

1.1.6 – Moléculas de unión a LPS

Al ingresar al torrente sanguíneo, el LPS puede causar shock séptico, dando lugar al daño de los órganos principales, y en el 60% de los casos llevando a la muerte. Por lo tanto, el desarrollo de procedimientos para su detoxificación es de suma importancia y urgencia. Los avances recientes en el descubrimiento de moléculas capaces de neutralizar endotoxinas se ha centrado en péptidos con la propiedad de unirse al LPS y neutralizar sus efectos tóxicos. Estos péptidos son la polimixina B [3, 60–66] y sus péptidos sintéticos derivados [67, 68], y también fragmentos de proteínas capaces de unirse al LPS, entre las que podemos citar, LBP [8, 69], LALF [41, 69], TALF [70], BPI [69, 71] y CAP37 [72] entre otros. Otras moléculas, como los anticuerpos antiendotoxinas [65, 73, 74], también han demostrado tener estas propiedades.

El uso de estos agentes no se limita solo al desarrollo de procedimientos para la detoxificación o remoción de endotoxinas, sino que también encuentran su aplicación en procedimientos preventivos, en sistemas capaces de detectar muy bajas concentraciones de endotoxinas.

1.1.6.1 – Anticuerpos antiendotoxinas

Dado que el lípido A es un elemento estructural común a todas las endotoxinas, presenta baja variabilidad y representa su centro endotóxicamente activo, este segmento del LPS fue considerado el objetivo ideal para la generación de anticuerpos que puedan reaccionar con muchos LPS serológicamente distintos. Si bien, estos anticuerpos anti-lípido A reaccionaron con una extensa variedad de lípidos A provenientes de bacterias de distinto origen, mostraron muy baja afinidad con LPS, o sea con lípido A conteniendo la porción polisacárida [65, 74], además de unirse inespecíficamente a un amplio rango de ligandos hidrofóbicos como por ejemplo lipoproteínas [3, 12].

En la actualidad, el desarrollo de vacunas para bacterias Gram-negativas y de sistemas de detoxificación de LPS basados en anticuerpos se centra en la utilización de la región sacárida del LPS [75–81]. En este caso, la problemática surge en la alta variabilidad que existe en la región del antígeno O entre distintas bacterias e incluso distintos serotipos de una misma bacteria. Si bien, esto limita su aplicación a una bacteria o LPS específico [12, 65] permite obtener anticuerpos con una elevada afinidad por un patógeno determinado.

Otras estrategias inmunoterapéuticas incluyen el bloqueo de la unión del LPS al CD14 con anticuerpos anti-CD14 o anti-LBP [82–86].

1.1.6.2 – Proteínas de granulocitos de unión a LPS

En el curso de una infección por bacterias Gram-negativas, el exceso de LPS generado es responsable de causar shock y falla orgánica múltiple. A la fecha, las terapias aplicadas para neutralizar efectivamente su toxicidad han sido limitadas. Las proteínas de unión a LPS derivadas del sistema inmune del hospedador pueden funcionar correctamente como moduladores de la actividad biológica del LPS. Tales proteínas se encuentran en una variedad de fuentes, incluyendo el suero, la membrana celular de las células del hospedador, amebocitos, y en insectos. Esta sección se centrará en aquellas proteínas de unión a LPS presentes en los granulocitos lisosomales: BPI (proteína que aumenta la permeabilidad bactericida), CAP57, CAP37 y CAP18 (proteínas antimicrobianas catiónicas), LZM (lisozima), LF (lactoferrina) y catepsina G.

1.1.6.2.1 – Proteína que aumenta la permeabilidad bactericida (BPI)

BPI es una proteína catiónica de masa molecular 55 kDa que está localizada en los granulocitos de los neutrófilos [39]. La proteína se une a la superficie de las bacterias Gram-negativas, alterando la permeabilidad de la membrana y causando la muerte celular [87]. Las características moleculares determinantes de su actividad específica están presentes dentro del fragmento N-terminal de unos 25 kDa. Esta porción aislada de BPI es un potente neutralizador de endotoxinas con indicación terapéutica en sepsis por meningococos. La potencia de neutralización de este fragmento, así como la de la proteína completa es similar para LPS liso y LPS de distintos mutantes (carentes de la región antígeno O). Este fragmento N-terminal exhibe dos características estructurales: a) Un elevado contenido de residuos básicos está concentrados en esta región (La carga neta es + 17), b) Hidrofobicidad. La primera posibilita una fuerte atracción electrostática con los sitios aniónicos en la región del lípido A y el núcleo sacárido del LPS y la última facilita la interacción hidrofóbica con la región del lípido A [88, 89].

1.1.6.2.2 – Proteínas antimicrobianas catiónicas (CAP)

Estas proteínas difieren sustancialmente en su masa molecular (57 kDa, 37 kDa y 18 kDa), composición de aminoácidos y actividad antimicrobiana. Las características de la proteína de mayor masa molecular son similares a la BPI humana [39].

El mecanismo de acción de CAP57 [90, 91] es similar al mecanismo de la polimixina B (sección 1.1.6.3.4). CAP37 además de poseer propiedades antimicrobianas, posee actividad de quimioatracción específica de monocitos [92, 93]. La homología entre CAP37 con la elastasa y catepsina G sugiere un mecanismo de acción análogo y una fuerte interacción con el LPS.

CAP18 es una proteína aislada originalmente de granulocitos de conejo y recientemente identificada en humanos. Está formada por 142 residuos y tiene un peso molecular aproximado de 18 kDa. La proteína está compuesta por dos dominios: una porción N-terminal cuya función no se conoce y un fragmento C-terminal que presenta propiedades de unión a LPS. Este fragmento presenta también actividad bactericida contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.

1.1.6.2.3 – Lisozima (LZM)

La lisozima es una enzima catiónica de baja masa molecular con propiedades bacteriolíticas mediadas por la hidrólisis del peptidoglicano de la pared celular bacteriana. En el ser humano se halla presente en altas concentraciones en las lágrimas y en menor cantidad en la saliva y el plasma y solo en trazas en la orina. En los tejidos, se halla principalmente en los pulmones, riñones y en la sangre. También, se ha hallado que la LZM se une al LPS y neutraliza su endotoxicidad y su actividad inmunofarmacológica [94-97]. La unión del LPS a la LZM no está caracterizada por un solo sitio de unión, sino múltiples sitios de unión con distintas afinidades. De esta forma, la unión a la enzima depende tanto del tiempo como de la temperatura. El mecanismo de unión también se ve afectado por el pH, viéndose favorecido a pH ácido. Sin embargo, una vez formado el complejo molecular, tanto los cambios de pH como los de fuerza iónica no afectan su integridad. Esto sugiere que la interacción inicial está mediada por interacción iónica y luego la estabilización del complejo se logra bajo interacciones de tipo hidrofóbicas. Este tipo de mecanismo es análogo al descrito para BPI.

1.1.6.2.4 – Lactoferrina (LF)

La lactoferrina es una glicoproteína monomérica no hémica de unión a hierro de 80 kDa presente en granulocitos de neutrófilos, así como en leche, lágrimas, y suero. El efecto bacteriostático relativo a la inhibición de la multiplicación bacteriana, está relacionado a su habilidad de captar Fe^{3+} que es esencial para el crecimiento y expresión de virulencia de algunos agentes patógenos [98-100]. El efecto bactericida radica en la capacidad de la lactoferrina de interaccionar con cationes divalentes como el Ca^{2+} que contribuyen a estabilizar la superficie bacteriana y con componentes bacterianos con carga negativa como el lipopolisacárido. Dicha interacción desorganiza y desestabiliza la superficie celular causando la pérdida de la permeabilidad y finalmente la muerte celular [100, 101].

1.1.6.2.5 – Catepsina G

La catepsina G es una proteasa tipo quimiotripsina que posee actividad antimicrobiana tanto para bacterias Gram-negativas como Gram-positivas y hongos. El punto isoeléctrico de la catepsina G es mayor a 12,5, y esta propiedad físicoquímica es

importante para la actividad antimicrobiana de la proteína así como para su fuerte interacción con el LPS [102].

1.1.6.3 – Otras moléculas de unión a LPS

En el marco del diseño de nuevas estrategias preventivas y terapéuticas se incluye el desarrollo o descubrimiento de una serie de moléculas que presentan una fuerte capacidad de unión a LPS provenientes de distintas fuentes u organismos.

1.1.6.3.1 – Proteína de unión a LPS (LBP)

En circulación, el LPS se une a la LBP, glicoproteína miembro de la superfamilia de proteínas que unen y transfieren fosfolípidos. La LBP circula en plasma de mamíferos asociada a las lipoproteínas de alta densidad (high-density lipoproteins, HDL) y su concentración incrementa 100 veces en plasma durante la respuesta de fase aguda. Esta proteína presenta un sitio de unión para el lípido A y participa en la respuesta celular del LPS, mediando la desagregación de agregados supramoleculares de LPS para formar el complejo LPS-LBP. De esta manera participa en la presentación del LPS a los receptores CD14m (Figura 1.5) asociados a membrana, presentes en células mieloides incluyendo monocitos y neutrófilos, iniciándose así la activación celular con la subsiguiente liberación de citoquinas (IL-1, IL-6 y TNF- α).

Por otro lado, el complejo LPS-LBP se une a las lipoproteínas plasmáticas resultando en la detoxificación del LPS [103, 104]. Se ha demostrado que la LBP incrementa la incorporación a las HDL de monómeros de LPS, ya sea desde su forma micelar o de complejos LPS-CD14s por un proceso en el cual las moléculas de LPS son intercambiadas por fosfolípidos.

1.1.6.3.2 – Factor *Limulus* anti-LPS (LALF o ENP)

En 1982, fue identificado en los amebocitos de la hemolinfa del *Limulus*, un anticoagulante que inhibe la cascada de coagulación mediada por LPS. Debido a este efecto, se lo llamó Factor *Limulus* anti-LPS (LALF). Resultados experimentales *in vivo* e *in vitro* indican que LALF se une y neutraliza LPS de numerosas y diferentes cepas de bacterias Gram-negativas [105]. Este factor fue aislado y caracterizado. Es una

proteína de punto isoelectrico 10,2 y pequeña que consta de una única cadena polipeptídica de 101 aminoácidos, con una masa molecular de aproximadamente 12 kDa.

La proteína exhibe un único dominio que consiste de 3 α -hélices empaquetadas frente a una lámina plegada β formada por 4 hebras (Figura 1.7). Las hebras 2 y 3 de la lámina plegada recorren el largo de la proteína formando un lazo anfifílico en forma de cuña. Estas hebras están unidas por un puente disulfuro que cierra el ciclo (entre la cisteína 31 y 52) [41, 106]. Este lazo involucra el sitio de unión al LPS.

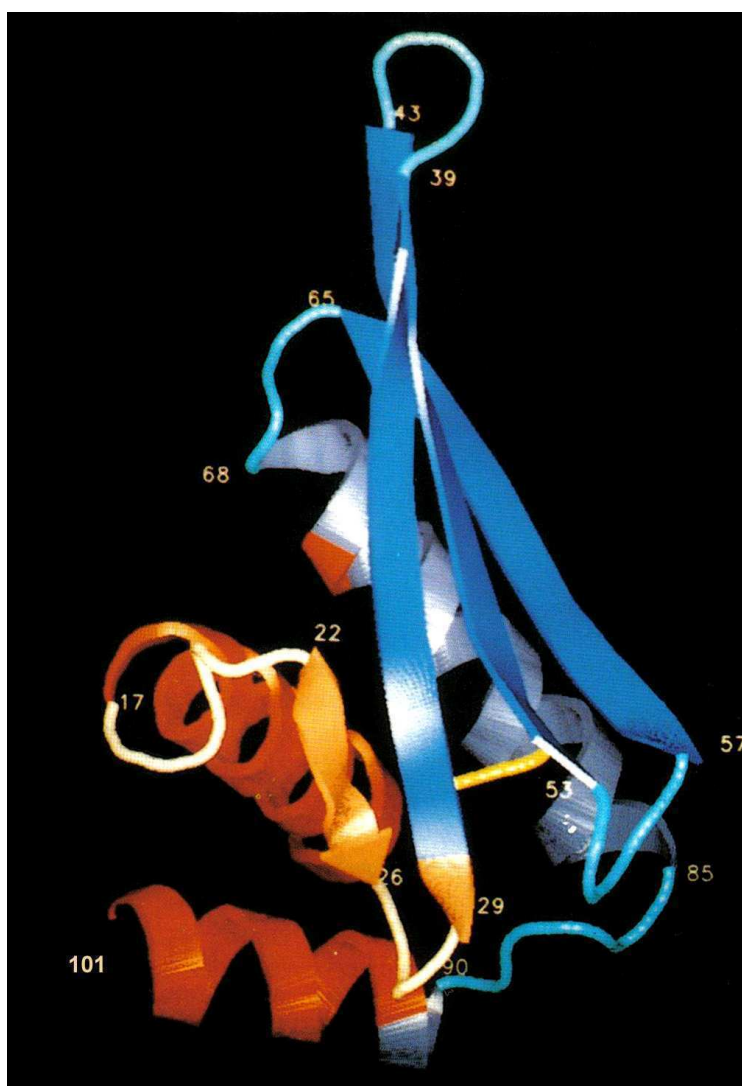


Figura 1.7: Representación esquemática de LALF con los extremos de la estructura secundaria numerados. Las hélices se muestran como tirabuzones, las hebras como flechas y los enlaces disulfuros como cuerdas amarillas. Los distintos tonos en rojo (aminoácidos 2-30, 92-101 y 72) indican la superficie negativamente cargada de la estructura del LALF. Los distintos tonos en azul (aminoácidos 31-91) indican la superficie positivamente cargada. El lazo anfifílico incluye a los aminoácidos 32-50 [106].

La secuencia de aminoácidos para el LALF fue dilucidada y usada como base para la síntesis del gen clonado en *E. Coli* y luego expresado como su forma recombinante (rENP o rLALF) en *Saccharomyces* y *Pichia pastoris* obteniéndose una proteína de 12.2 kDa con un punto isoeléctrico de 8.5 que neutraliza la actividad biológica de LPS. Esta proteína contiene 105 aminoácidos, puesto que adiciona, respecto de la proteína natural, la secuencia de aminoácidos Glu-Ala-Glu-Ala a su porción N-terminal [107].

La distribución de la carga superficial del LALF es bipartita (Figura 1.7) [106]: la superficie izquierda inferior contiene los 6 grupos ácidos y ningún grupo básico. La superficie derecha superior contiene solo grupos básicos. Por lo tanto, a pH neutro, la molécula actúa como un dipolo. Los residuos cargados positivamente apuntan hacia el mismo lado favoreciendo el acercamiento del LPS por fuerzas electrostáticas entre sus grupos fosfato y los grupos aminos de los aminoácidos. Por otro lado, los residuos hidrofóbicos quedan contenidos en el interior de la proteína, siendo los responsables de estabilizar el complejo por fuerzas de van der Waals con las cadenas arílicas del LPS.

1.1.6.3.3 – Factor C

El Factor C activa la cascada de coagulación del lisado de amebocitos del *Limulus*. Puede existir como cadena simple con una masa molecular estimada de 123 kDa o como doble cadena. Contiene una serie de dominios estructurales, 3 de los cuales, localizados en la porción N-terminal, exhiben una alta afinidad por el LPS. Estos dominios son Sushi 1, Sushi 2 y Sushi 3. Se unen al LPS cooperativamente, con constantes de disociación del orden de 10^{-12} M [108].

1.1.6.3.4 – Polimixina B (PmB)

Las investigaciones de las interacciones entre el LPS (o lípido A) y oligopéptidos fueron motivadas a partir del hallazgo que la polimixina B (PmB), un antibiótico peptídico catiónico cíclico, se une al lípido A [109] con una constante aparente de disociación en el intervalo del micromolar [110] neutralizando su patogenicidad. La acción del antibiótico puede atribuirse a su capacidad de alterar la membrana celular de la bacteria [111]. La polimixina E (PmE) difiere en solo un aminoácido en la posición 6 y posee funciones biológicas similares. Desafortunadamente, PmB es tóxico y no puede ser empleado para terapia. Sin embargo, se la utilizada ampliamente en la industria

biotecnológica como ligando en columnas de afinidad [14] y se comercializa para uso clínico en cartuchos de hemoperfusión extracorporal (“Toraymyxin”, Toray Industries Inc., Tokio).

A partir de los estudios sobre la estructura y función biológica de la PmB, se han sintetizado péptidos que imitan su estructura primaria y secundaria y poseen la capacidad de unirse y detoxificar al LPS o lípido A [68]. Varios factores son responsables de la capacidad de unión del péptido al lípido A, incluyendo la naturaleza anfifílica y catiónica de la estructura primaria, el tamaño de la estructura, y la conformación del péptido. La estructura de la polimixina B ha sido determinada en su forma libre y unida a lípido A [63]. En el complejo lípido A-PmB los grupos carbonilo forman una superficie polar sobre una cara de la porción cíclica del péptido, la cual se encuentra sobre la estructura glicosídica hidrofílica del lípido A, y la parte lineal conteniendo la cadena hidrocarbonada del péptido, se ubica paralela a las cadenas acílicas del Lípido A, lo cual constituye la base de la interacción hidrofóbica entre el péptido y el LPS. Los grupos γ -NH₂ de los residuos Dab (α,γ -ácido diaminobutírico) apareados (Dab3/Dab4 y Dab7/Dab8) forman una unión iónica bidentada con los grupos fosfato del lípido A.

1.2 – Selectividad química y reconocimiento molecular

El término reconocimiento molecular es un término adoptado de la química biológica, en algunos casos utilizado en el área de sensores para describir procesos químicos de transducción basados en selectividad. La selectividad es un término bastante más amplio que el reconocimiento molecular y puede alcanzarse en procesos químicos no relacionados con procesos biológicos. En un sentido bioquímico, el reconocimiento molecular pertenece a una interacción altamente específica que implica la formación de enlaces por complementariedad y funciones biológicas [112]. La complementariedad estructural es el resultado de múltiples enlaces débiles, por ejemplo, unión puente de hidrógeno, iónico, y van der Waals, los cuales en conjunto dan lugar a una evidente interacción global fuerte. De esta forma, el analito se une fuertemente al sitio activo de una enzima, un antígeno se une fuertemente a una región apropiada de un anticuerpo complementario o un receptor celular da origen a su función biológica a partir del reconocimiento molecular de una sustancia química específica, tal como la apertura de un canal iónico, exocitosis, o transmisión neuronal.

Para el diseño de muchos biosensores, el reconocimiento molecular biológico se utiliza en el paso de transducción química. Las moléculas biológicas inmovilizadas, por ejemplo, enzimas, anticuerpos, células, y tejidos, exhiben en esos dispositivos su función biológica producto de la interacción molecular a través de uniones específicas. En otros sensores, particularmente en aquellos donde la transducción química esta basada en la selectividad de moléculas no biológicas, el reconocimiento molecular no necesariamente forma parte de la selectividad del dispositivo. La unión metal-ligando, partición entre fases, y exclusión por tamaño o carga, son algunos ejemplos de mecanismos de selectividad no basados en reconocimiento molecular.

1.2.1 – Inmunoensayos [113]

Los inmunoensayos son una técnica analítica que utiliza anticuerpos en la etapa de reconocimiento específico de un analito. Las principales características que se le atribuyen a este tipo de ensayos son su sensibilidad, selectividad, sencillez, rapidez y bajo costo. Estas características hicieron que los inmunoensayos se conviertan en una de las contribuciones tecnológicas más productivas a la medicina y la investigación en ciencias de la salud.

Las características únicas de los inmunoensayos provienen de tres propiedades importantes que poseen los anticuerpos: 1) Su habilidad de unirse a una gran variedad de analitos químicos naturales y sintéticos, biomoléculas, células y virus. 2) Especificidad excepcional por la sustancia a la cual cada anticuerpo se une. Esto permite determinar la presencia de una molécula específica en presencia de otras similares y en concentraciones muy bajas (10^{-12} M). 3) La fuerza de unión entre el anticuerpo y su analito específico. Este tipo de interacción prevalece durante los pasos de procesamiento y medición.

La fuerza de unión primaria entre el anticuerpo y el antígeno es iónica (interacción de largo alcance), operando sobre distancias del orden de los 10 nm. Luego la exclusión del agua de hidratación permite la formación de enlaces hidrógeno y a una distancia de 0,5-0,15 nm, las fuerzas de van der Waals (interacción de corto alcance) entre dipolos sobre átomos adyacentes se vuelven más importantes y fortalecen la unión. La fuerza de unión entre las dos especies puede ser descripta por su constante de equilibrio, K_{eq} . Valores de K_{eq} típicamente se encuentran en el intervalo de $10^6 - 10^{12}$ M^{-1} .

La cantidad de configuraciones que puede adoptar un inmunoensayo es ciertamente enorme, incluso una vez elegido el tipo de inmunoensayo es posible elegir entre varios formatos, cada uno de los cuales con sus propias características de rapidez, sencillez y sensibilidad. Algunas de las configuraciones relacionadas con este trabajo de tesis se describirán más adelante.

1.2.1.1 – Ensayo inmunométrico [113]

El inmunoensayo más simple de entender es el diseño inmunométrico. El anticuerpo inmovilizado sobre una superficie de plástico (tal como poliestireno) captura al analito de la muestra, y un anticuerpo diferente, específico de alguna otra parte de la molécula de analito se utiliza como base para la generación de la señal. Este último anticuerpo está marcado, por ejemplo, con un isótopo radioactivo. Luego de la incubación para permitir que los anticuerpos se enlacen al analito, se lava el anticuerpo marcado no unido. La etapa final del ensayo involucra la medición de la señal correspondiente, siendo en este ejemplo una medida de radioactividad. La señal será en consecuencia proporcional a la concentración de analito en la muestra.

El componente marcado del ensayo se denomina *marcador*. Al analito al cual el anticuerpo se une específicamente se lo denomina *antígeno*. La remoción eficiente del marcador no unido es una parte crítica del ensayo, conocida como *separación*. El material sobre el cual el anticuerpo se une de forma irreversible es la *fase sólida*. Dado que los anticuerpos forman un sándwich alrededor del analito, los ensayos inmunométricos son también denominados ensayos tipo *sándwich* (Figura 1.8).

El ensayo puede utilizar distintos tipos de marcadores, por ejemplo una enzima en lugar de un isótopo radioactivo. Las enzimas, con su sustrato apropiado, pueden utilizarse para generar color o crear productos fluorescencia o quimioluminiscentes. Cada molécula de enzima puede convertir muchas moléculas de sustrato, lo que provee un sistema de generación de señal muy sensible. Esta configuración de ensayo se conoce como ELISA (Del inglés Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Las enzimas empleadas en inmunoensayos deben cumplir una serie de requisitos, entre los cuales se destaca: 1) Poseer una elevada actividad específica. 2) Ser compatible con un amplio intervalo de medios de reacción y condiciones de ensayo (pH, fuerza iónica, etc.). 3) Ser fácilmente conjugable. 4) Poseer una baja unión inespecífica al anticuerpo y a la fase sólida. Existe un gran número de enzimas que

cumplen estos requisitos. Algunos ejemplos son la peroxidasa de rábano picante (HRP) y la fosfatasa alcalina (AP).

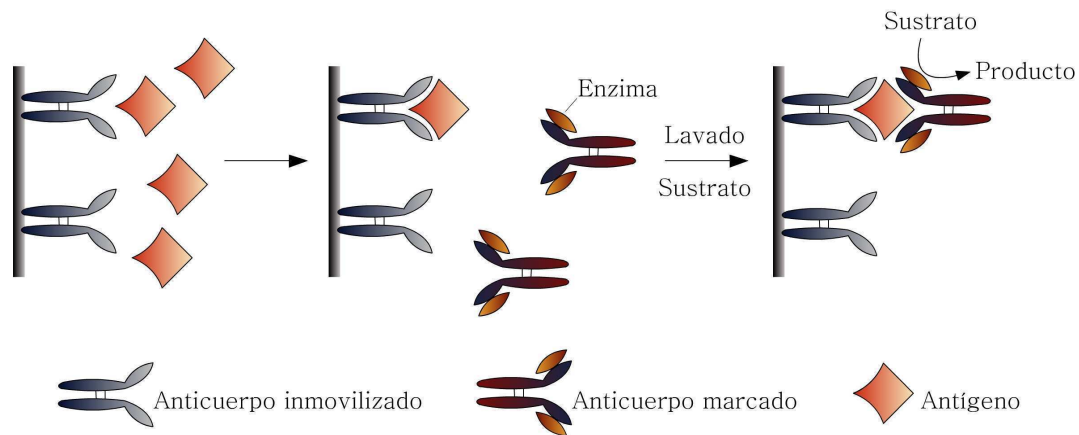


Figura 1.8: Esquema de un ensayo inmunométrico.

1.2.1.2 – Ensayo competitivo

En el ensayo inmunométrico, el analito tiene que ser suficientemente grande como para poder unirse simultáneamente a 2 anticuerpos, además de poseer 2 sitios de reconocimiento distintos, lo cual no es siempre posible.

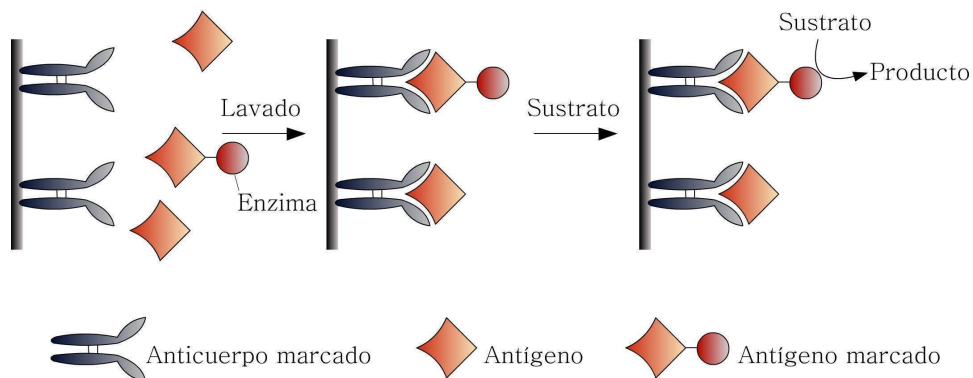


Figura 1.9: Esquema de un inmunoensayo competitivo.

Un diseño distinto puede implementarse donde solo se requiere un anticuerpo y el marcador correspondiente, que no es un segundo anticuerpo sino que es el analito marcado con una especie fluorescente, radioactiva o una enzima, al cual se lo denomina *conjugado*. Este tipo de diseño de inmunoensayo se denomina inmunoensayo competitivo (Figura 1.9). El conjugado, que es el que produce el proceso medible, debe

conservar la capacidad de interacción con la biomolécula de reconocimiento. Los ensayos competitivos están ampliamente desarrollados en la bibliografía como un tipo especial de inmunoensayos [113].

En este ensayo, el anticuerpo inmovilizado se pone en contacto simultáneamente con el conjugado y el analito, los cuales compiten por los sitios de unión de los anticuerpos. Luego de una etapa de lavado, se mide la señal generada por el conjugado. Para altas concentraciones de analito se logra unir poco conjugado y la señal es muy baja, mientras que para muy bajas concentraciones de analito, una gran cantidad de conjugado está unido y la señal es máxima. La cantidad de conjugado que se une al anticuerpo inmovilizado, y por ende la señal, es inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra.

1.2.2 – Ensayos de reconocimiento no inmunológicos

En los inmunoensayos, la característica fundamental es la bioafinidad, esto es, la unión del analito con el ligando, sin importar la naturaleza del ligando. Esto hace posible el reemplazo de los anticuerpos por otras moléculas con alta afinidad por el analito. En algunos casos, estos ensayos surgen debido a la necesidad de ensayos para multiespecies, que no pueden llevarse a cabo con anticuerpos debido a la ausencia de sitios antigénicos comunes para distintas especies no relacionadas, y por lo tanto emplean receptores específicos no inmunológicos. A estos ensayos se los conoce como ELSA (Del inglés Enzyme-linked Sorbent Assay). La señal se genera de la misma forma ya descrita para la configuración del ELISA.

Otra de las moléculas que se pueden aplicar a este tipo de configuraciones son ciertos oligonucleótidos con afinidad por una molécula en particular denominados aptámeros. Estas moléculas tienden a reemplazar a los anticuerpos, tanto en técnicas separativas como de diagnóstico. Los aptámeros son oligonucleótidos (ADN ó ARN) con la capacidad de unirse con alta afinidad y especificidad a un extenso número de analitos tales como drogas, proteínas u otras moléculas orgánicas e inorgánicas con constantes de afinidad comparables a la unión antígeno-anticuerpo ($10^{-6} - 10^{-12}$ M) [114, 115].

Estos mismos conceptos también pueden aplicarse al desarrollo de sistemas de detección de analitos específicos basados en ensayos competitivos.

1.3 – Transducción electroquímica

La palabra, transductor, proviene de la palabra en latín *transducere*, que significa “llevar o guiar a través”. La función analítica de un transductor es guiar a través de la información química sobre el analito de modo que ésta pueda ser procesada como una señal eléctrica para la adquisición de información e interpretación. Por ejemplo, un fototubo transduce la luz en una señal eléctrica que puede ser tomada por un registrador o una computadora. Esto representa un proceso de transducción de energía típico de cualquier método instrumental. Otro tipo de procesos, como la transducción química involucran la conversión de información del dominio químico al dominio eléctrico. Dentro de los tipos de transducción química se incluyen el monitoreo ion-selectivo, reacciones catalizadas enzimáticamente, unión inmunoquímica, y la unión complementaria de oligonucleótidos.

Como se ha introducido anteriormente, en inmunoensayos se utilizan marcadores de forma tal de poder detectar la reacción entre el ligando y el receptor. Esos marcadores pueden ser radioisótopos, enzimas, fluoróforos, etc. El uso de enzimas como marcadores provee un sistema de generación de señal muy sensible dado que cada molécula de enzima puede convertir muchas moléculas de sustrato. Si durante el proceso de la reacción enzimática se generan o consumen especies electroquímicas como electrones, iones o compuestos con estados de oxidación variables, puede realizarse una detección de tipo electroquímica, ya sea conductimétrica, potenciométrica o amperométrica. La detección amperométrica involucra mantener el potencial del electrodo de trabajo, que representa tanto el transductor para la detección enzimática como el soporte donde se inmoviliza el receptor biológico, y determinar la corriente que circula. Generalmente se mide la respuesta de la oxidación o reducción del producto o sustrato de la enzima. La mayor parte de los electrodos utilizados en ensayos de reconocimiento molecular están basados en el uso de enzimas oxidoreductasas como marcadores. Estas enzimas contienen centros redox que cambian durante la reacción bioquímica. Las oxidasas y las deshidrogenasas son enzimas de este tipo. Las enzimas redox pueden ser clasificadas según la naturaleza del grupo prostético asociado; flavina, quinona, hemo o cobre. Dentro de las oxidasas, la peroxidasa de rábano picante (HRP) es de particular interés en el marco de esta tesis.

Salvo algunas excepciones [116], la transferencia directa de electrones desde el electrodo a las oxidoreductasas es un proceso ineficiente. La dificultad se debe a la localización del centro electroactivo muy inmerso en la estructura de la enzima o debido

al efecto superficial relacionado a la adsorción y orientación de la macromolécula. Este inconveniente se puede superar utilizando un cosustrato intermediario, denominado mediador. Los mediadores difusionales son moléculas que pueden transportar y transferir los electrones producidos o consumidos por la acción enzimática, entre el electrodo y el centro redox de la enzima. De esta forma se puede determinar la actividad de la enzima a través de la señal del mediador.

El mediador también juega un rol importante respecto de la eliminación del efecto de depleción de oxígeno sobre la señal de los sistemas basados en oxidoreductasas convirtiéndose en el cosustrato sustituto para las oxidasas.

Un mediador apropiadamente elegido llegará simultáneamente al equilibrio entre ambos, el biocomponente y el electrodo. La transferencia de electrones ocurrirá al potencial del mediador sin el requisito de un elevado sobrepotencial para el biocomponente.

Varios de los mediadores más utilizados en dispositivos enzimáticos amperométricos corresponden a complejos metálicos de hierro, osmio y rutenio. Otros también ampliamente utilizados son quinonas, hidroquinona y 1,4-benzoquinona por ejemplo.

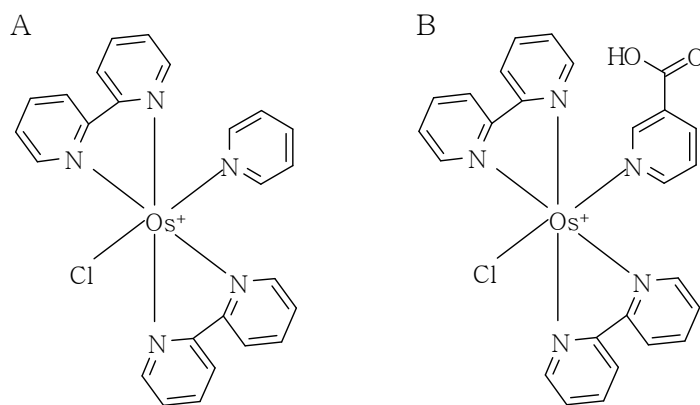


Figura 1.10: Estructura de los mediadores solubles empleados en esta tesis. A) $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCl}]^+$. B) $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}(\text{pyCOOH})]^+$.

El uso de mediadores, para superar la incapacidad de la enzima de transferir electrones en forma directa a la superficie del electrodo, presenta varias alternativas; la inmovilización del mediador sobre la superficie del electrodo, la inmovilización conjunta del mediador y la enzima en la superficie del electrodo, o incluso la unión covalente del mediador a la enzima [117–121].

En este trabajo de tesis se utilizó el mediador redox soluble $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCl}]^+$. En el desarrollo de un ensayo competitivo utilizando LPS-biotina [122] se implementó un mediador redox similar; $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}(\text{pyCOOH})]^+$ (Figura 1.10).

1.4 – Peroxidasa de rábano picante isoenzima C (HRP-C)

Las peroxidasas son hemoenzimas extracelulares que pueden encontrarse en plantas, participan en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular, la polimerización de componentes de la pared celular y la oxidación de metabolitos secundarios esenciales importantes en las reacciones de defensa. De todas las peroxidasas, la más estudiada es la peroxidasa de rábano picante (HRP). Alrededor de 40 isoenzimas han sido detectadas a partir de preparaciones comerciales impuras. En términos prácticos, la mayor parte de los trabajos experimentales se centran en solo tres isoenzimas: isoenzima A (ácida); isoenzima C (neutra o ligeramente básica), y una HRP fuertemente básica [123]. Esta isoenzima ha sido denominada cianoperoxidasa dado que se aísla de plantas como un complejo ciano-férrico [124]. De estas tres isoenzimas, la más estudiada es la isoenzima C y justamente es la isoenzima que se utiliza en esta tesis. De aquí en adelante la descripción se centrará en HRP-C.

La HRP-C consiste en 308 residuos de aminoácidos. El extremo N-terminal está bloqueado por un residuo de pirrolidín carboxílico. El extremo C-terminal corresponde a un residuo de serina. El grupo prostético hemo (hierro-porfirina) está unido a través de la posición de coordinación 5 del Fe (III) a la cadena lateral de imidazol de la histidina 70. Ambos, la histidina próxima y un residuo histidina distante situado dentro del entorno del enlace puente de H del ligando H_2O cumplen un rol fundamental en la actividad catalítica. Existen ocho cadenas laterales neutras de carbohidratos unidas a través de residuos de Asn 13, 57, 158, 186, 198, 214, 250 y 268, y hay cuatro puentes disulfuros entre los residuos de Cys 11-91, 44-49, 97-301 y 177-209. La enzima posee dos iones Ca^{2+} por molécula. La estabilidad térmica de la enzima disminuye al remover el Ca^{2+} . Los iones Ca^{2+} contribuyen a la estabilidad estructural en la región del sitio activo [125]. Si bien no participan en el mecanismo catalítico, su remoción causa una perturbación en la vecindad del hemo, lo cual produce una disminución de la actividad enzimática. Los residuos de aminoácidos poseen una masa de 33890 Da, el grupo hemo 550,5 Da, y los dos iones Ca^{2+} 80 Da, resultando en una masa molecular de 34520 Da. La región oligosacárida corresponde al 18 % de la enzima, resultando en una masa molecular total para la HRP-C de 42100 Da [126].

El espectro de absorción de la enzima en agua se caracteriza por una banda de absorción intensa a 403 nm, correspondiente a la banda Soret del grupo hemo, con un coeficiente de absorción molar de $102000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [127]. La enzima es estable a temperatura ambiente en un intervalo de pH entre 5 y 10.

Las peroxididasas catalizan la oxidación de un extenso número de sustratos orgánicos por peróxido de hidrógeno y por peróxidos orgánicos.

1.4.1 – Actividad catalítica

El ciclo catalítico de la HRP se muestra en la Figura 1.11. E_{1OX} y E_{2OX} son los estados oxidados de la ferriperoxidasa nativa (E), usualmente denominados compuestos I y II, respectivamente. Q es el sustrato reductor y P es la contraparte oxidada. El primer paso corresponde a una transferencia rápida de oxígeno del peróxido de hidrógeno a la porfirina férrica (Fe^{III}) de la HRP (formalmente una oxidación de $2e^-$) para formar el intermediario catión π radical hemo oxiferril ($[Fe^{IV}=O]^{\bullet+}$) E_{1OX} (estado de oxidación formal del hierro: +V) y agua. En el segundo paso, el catión radical de la porfirina del compuesto I se reduce por Q (proceso de $1e^-$) para dar el intermediario oxiferril E_{2OX} (estado de oxidación formal del hierro: +IV) y el producto P . En el último paso, la enzima vuelve a su forma nativa (E) mediante un proceso que involucra $1e^-$ y $2H^+$. E_{2OX} se reduce por una segunda molécula Q para dar un segundo equivalente de P y agua. Un esquema del ciclo catalítico de la enzima más detallado y una discusión más completa pueden encontrarse en [128].

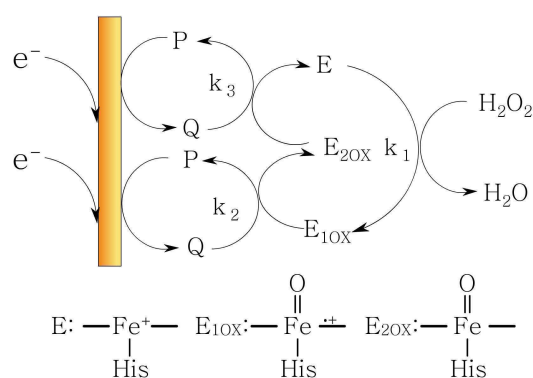


Figura 1.11: Esquema simplificado del ciclo catalítico de la HRP. H_2O_2 es el sustrato de la enzima, Q es el cosustrato y P el producto. Abajo del ciclo se indican la estructura del centro redox de la enzima en sus distintos estados de oxidación.

La respuesta electroquímica permite sensor la concentración de H_2O_2 en solución. Se puede obtener una alta sensibilidad a potenciales donde la directa reducción del peróxido es despreciable, dado que la respuesta electroquímica se ve incrementada por las propiedades catalíticas de la enzima. Alternativamente, se puede utilizar la misma respuesta como una medida de la presencia de la enzima, de nuevo haciendo uso de la ventaja que proveen las propiedades catalíticas de la misma. Este comportamiento propulsa el uso de la enzima en el desarrollo de microelectrodos basado en HRP [129–131], dispositivos amperométricos multienzimáticos [132, 133], inmunoensayos [134, 135], etc.

1.5 – Antecedentes

1.5.1 – Sistemas de detección de endotoxinas

La sepsis severa es una frecuente y compleja amenaza vital, que compromete más de 18 millones de personas al año a nivel mundial, lo que equivale aproximadamente a 1.400 personas fallecidas por día, cifra equivalente a la población total de Dinamarca, Finlandia, Irlanda y Noruega sumadas.

Por su causa, cada año mueren más de 135000 pacientes en Europa y 215000 pacientes en Estados Unidos [136], cifra similar a la asociada al infarto agudo de miocardio, siendo la sepsis severa la causa más frecuente de muerte en unidades de terapia intensiva no coronaria. Esta incidencia puede ser aun más elevada, si consideramos que las muertes son atribuidas frecuentemente a complicaciones del cáncer o la neumonía, y no específicamente a la sepsis. Todos estos datos muestran que la mortalidad global de los pacientes sépticos oscila entre el 28 y el 50 % dentro del primer mes del diagnóstico, siendo comparable a la tasa de mortalidad hospitalaria a 30 días que en 1960 presentaban los pacientes internados por infarto agudo de miocardio. Otro dato no menos preocupante es que el número de sepsis severas crece anualmente a una tasa de 1,5 % por año, lo que suma un millón adicional de casos anuales sólo en Estados Unidos para el año 2020.

Frente a estos datos queda claro que la sepsis es un síndrome complejo, difícil de definir, diagnosticar y tratar. Se caracteriza por un abanico de condiciones clínicas causadas por la respuesta sistémica del organismo frente a una infección, que de llegar a sepsis severa se acompaña de disfunción y falla orgánica de uno o varios sistemas

llevando a la muerte en la mitad de los casos. La falta de claras definiciones hace del diagnóstico y manejo de la sepsis un desafío clínico.

La sepsis puede iniciarse por una liberación masiva de lipopolisacárido proveniente de la pared celular de bacterias Gram-negativas, el cual activa en forma inapropiada el sistema inmune innato [137]. Actualmente, el ensayo enzimático del lisado de amebocitos del *Limulus Polyphemus* (LAL) se utiliza ampliamente en la detección y cuantificación de endotoxinas en muestras clínicas y no clínicas. La forma más sencilla de ensayo LAL es el ensayo en gel [53, 54]. También existen dos técnicas adicionales: el ensayo LAL turbidimétrico y el ensayo LAL cromogénico [55], siendo ambas técnicas cinéticas. Si bien, estas dos últimas versiones del test LAL son más sensibles y precisas que su predecesor también presentan ciertas limitaciones.

La mayor debilidad del ensayo en gel es su baja precisión (la concentración de endotoxinas entre dos diluciones consecutivas usualmente varía en un orden de magnitud), susceptibilidad al error humano (el reconocimiento de la formación del gel depende de la interpretación del analista), y un considerable requerimiento de tiempo de ensayo (deben realizarse varias diluciones para determinar la concentración de endotoxina). Los ensayos turbidimétrico y cromogénico, aunque poseen mayor precisión y son más rápidos que el ensayo en gel, no pueden utilizarse en fluidos con turbidez inherente tales como la sangre y líquidos con tinte amarillo, ej. la orina, y su desempeño puede verse comprometido por cualquier posible precipitación. Por otro lado, como todo ensayo enzimático, el ensayo LAL es muy sensible pero altamente susceptible a los cambios de temperatura y pH. Más aún, algunos derivados de carbohidratos tales como β -glicanos también reaccionan positivamente en este ensayo [138].

Debido a la elevada toxicidad del LPS y a la búsqueda de alternativas a las distintas variantes del ensayo LAL, existe un esfuerzo en el desarrollo de sistemas específicos de detección de LPS que puedan ser capaces de detectarlo en pequeñas cantidades. Si bien en los últimos años se han propuesto algunos métodos alternativos, el volumen de publicaciones en esta área es limitado, en contraste con la relevancia del tema a nivel mundial.

Para comprender la relación entre la estructura y la función de lipopolisacáridos, se requieren métodos de exploración rápidos y sensibles. El problema general en la detección de LPS, por ejemplo con detectores ópticos convencionales (UV/Vis, fluorescencia) es la carencia de grupos ópticamente activos en su estructura química. Por otro lado, el LPS tampoco presenta comportamiento electroactivo que permita su detección directa por técnicas electroquímicas clásicas. Además, el panorama se

complica teniendo en cuenta que los lipopolisacáridos poseen una fuerte tendencia a formar agregados de alta masa molecular en soluciones acuosas [31]. A pesar de todos estos aspectos, algunos trabajos han introducido una variedad de alternativas a la detección de endotoxinas. En el año 2001, un método interesante fue publicado donde utilizando la propiedad fotoluminiscente del silicio poroso se podía distinguir bacterias Gram-negativas de Gram-positivas [139]. El sensor involucraba la modificación de la superficie con un receptor sintético (tetratriptofano-*ter*-ciclo pentano, designado TWTCP) para lípido A. De esta forma, en presencia del lisado de la bacteria se evidenciaba un corrimiento en la longitud de onda del pico de fotoluminiscencia. Este corrimiento presentaba diferentes magnitudes en función del tipo de bacteria ensayada con una sensibilidad cercana a 1,7 μg de bacteria lisada. Brock y colaboradores [140] desarrollaron un método basado en la desactivación de la fluorescencia de un derivado peptídico de CD14 funcionalizado en sus terminales carboxi y amino con fluoresceína y un derivado de la rodamina (Tamra) respectivamente. En la presencia de LPS, el derivado peptídico fluorescente de CD14 evidencia un cambio conformacional disminuyendo la desactivación de la fluorescencia, pudiéndose medir la fluorescencia resonante de transmisión de energía (FRET). Con este diseño los autores informan un límite de detección cercano a 150 nM. Ong y colaboradores [141], por su parte, desarrollaron un sistema basado en el uso de sensores magnetoelásticos [142, 143], donde la respuesta frecuencia-amplitud se modifica como una función de la viscosidad de su ambiente. Aplicando este concepto pudieron establecer una forma sencilla y reproducible de detectar la formación del gel correspondiente al ensayo LAL en gel. Si bien el método minimiza la susceptibilidad al error humano, sigue asociado a la química del ensayo LAL y con ello a sus limitaciones.

Otros grupos de investigación abordaron la problemática aplicando el uso de técnicas separativas como la electroforesis y la cromatografía gaseosa. Kilár y colaboradores [144], apoyándose en el hecho de que la hemoglobina (Hb) da lugar a la formación de complejos con el LPS, pudieron evaluar el contenido de endotoxinas en muestras acuosas, con un límite de detección cercano a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, por electroforesis capilar monitoreando la longitud de onda a 405 nm, donde la hemoglobina posee su máximo de absorción en el intervalo visible. También, este mismo grupo ha obtenido resultados similares mediante el uso de electroforesis en microchips [145]. Binding y colaboradores [146] analizaron muestras acuosas y aéreas de LPS, previo tratamiento hidrolítico y derivatización de los ácidos grasos con trifluoracetamidas, por

cromatografía gaseosa acoplada con detección por espectrometría de masa pudiendo acceder a límites de detección de 5 ng de LPS por muestra.

En el área de la electroquímica también se han aportado algunas alternativas a la detección de endotoxinas. En el año 2007, Kato y colaboradores [147], publicaron un dispositivo basado en la interacción de un derivado electroactivo del ácido borónico y la región sacárida del LPS, el cual en conjunto con una enzima inmovilizada en la superficie del electrodo, la Diaforasa (Dp), provee de la plataforma de detección. Si bien se obtiene un límite de detección aceptable, 50 ng mL^{-1} , posee la limitación inherente de las interferencias que puedan ocasionar otros hidratos de carbono. Previo a la publicación de este artículo, en el año 2005 nuestro grupo de investigación presentó un sistema de detección de lipopolisacárido basado en un ensayo competitivo amperométrico [148]. En este trabajo, una superficie de oro funcionalizada con una proteína de reconocimiento de LPS, ENP, permite llevar a cabo un ensayo competitivo entre un derivado de LPS con HRP, LPS-HRP, y LPS proveniente de la muestra a analizar. De esta forma, la competencia entre el conjugado LPS-HRP y el LPS, por los sitios de reconocimiento específico de LPS en la superficie del electrodo, da lugar a la disminución de la corriente amperométrica a medida que la concentración del LPS en la muestra aumenta. El sistema propuesto presentaba dos configuraciones caracterizadas por la naturaleza de la inmovilización del elemento de reconocimiento, una configuración covalente y otra electrostática. La configuración electrostática proveía un límite de detección satisfactorio, $0,2 \text{ UE mL}^{-1}$, por debajo de los límites impuestos para drogas inyectables, $0,25 \text{ UE mL}^{-1}$, y baños de diálisis, 2 UE mL^{-1} , por la Farmacopea Americana y Sueca [149], y por AAMI (Association for the Advancement of Medical Instrumentation) [150], respectivamente. La configuración covalente presentaba un límite de detección superior, 1 UE mL^{-1} , pero un mejor comportamiento en un intervalo de concentraciones más amplio. Si bien el desarrollo de este sistema propició un adelanto en el marco del desarrollo de alternativas para la detección de endotoxinas, algunos puntos clave debían ser reevaluados y mejorados. El uso de un conjugado comercial (AlerCHEK Inc.) de LPS con HRP de baja actividad endotóxica ($0,012 \text{ UE ng}^{-1}$) obligaba a utilizar concentraciones elevadas de conjugado produciendo en consecuencia un aumento de la señal debida a la adsorción inespecífica sobre el electrodo. En consecuencia, la diferencia en la corriente entre concentraciones extremas de LPS (concentración de saturación y concentración cero de LPS) se veía disminuida, afectando la sensibilidad del ensayo. Otro de los puntos, íntimamente relacionado con el anterior, era el comportamiento de la superficie respecto a la

adsorción inespecífica del conjugado LPS-HRP. En este tipo de ensayos es fundamental disponer de una superficie que interaccione fuertemente de forma específica con el analito pero que rechace su adsorción cuando esta no esté mediada por reconocimiento específico. De esta forma, la construcción de una superficie que presente este comportamiento es un aspecto fundamental del desarrollo de este tipo de dispositivos.

1.5.2 – Síntesis de conjugados de LPS

Como se ha introducido en la sección anterior, uno de los puntos clave que se busca mejorar en este trabajo de tesis, respecto del desarrollo de un ensayo competitivo amperométrico, es la calidad de los conjugados de LPS. En la modificación de lipopolisacárido se busca obtener un derivado que presente un buen grado de funcionalización conservando su actividad endotóxica. En este sentido, observando su estructura química, la única región susceptible de modificación sin una pérdida significativa de actividad endotóxica es la región correspondiente al antígeno O. La principal dificultad que surge en la modificación de LPS con buen rendimiento es su elevada tendencia a formar agregados de alta masa molecular en solución acuosa a partir de concentraciones bastante inferiores de las que se suelen utilizar en los protocolos de síntesis [31].

Debido a las propiedades químicas de los LPS, el estudio de sus rutas metabólicas [151-153], su interacción con moléculas de reconocimiento [61, 148] o superficies modificadas [154], se realiza empleando LPS marcado. En los últimos años son escasos los trabajos que presentan procedimientos sintéticos de modificación de LPS liso para la obtención de conjugados. En la mayoría de los casos, el LPS, previo a su modificación, se trata químicamente de modo de eliminar la región del lípido A (LPS detoxificado) [75-81], lo que lleva acompañado en consecuencia de la pérdida de su propiedad de agregación, resumiendo la síntesis a la modificación de un oligosacárido. Este tipo de procedimientos son útiles en el desarrollo de vacunas, dado que la región del antígeno O es el mayor factor de virulencia en el LPS, sin embargo pierden su capacidad endotóxica producto de la carencia de lípido A. En otros casos, la modificación del LPS procede en la región del lípido A [155, 156], afectándose la actividad pirogénica del derivado resultante.

Otros autores han reportado, aunque en un volumen más limitado de publicaciones, la modificación de LPS liso o proveniente de cepas mutantes. En la mayoría de los casos la marcación se logra con radioquímicos por incorporación

metabólica [157–160], un método laborioso con los típicos cuidados que implica la manipulación de material radioactivo. Como sondas para la modificación de LPS se ha empleado principalmente el isotiocianato de fluoresceína (FITC) por reacción directa con los grupos hidroxilos de la región sacárida del LPS [151, 152, 161], limitando su uso a derivados de tipo isotiocianato. Triantafilou y colaboradores han presentado un procedimiento para modificar LPS Re595 con hidracida de Alexa 488, previa oxidación enzimática con galactosa oxidasa y neuraminidasa [162]. En este trabajo, los autores notan un buen rendimiento de conjugación de LPS Re595, sin embargo, en nuestra experiencia (ver capítulo 5) este método no provee buenos resultados con LPS liso, limitando su uso a un solo tipo de LPS. En otros trabajos se ha presentado el uso de peroxidasa de rábano picante (HRP) [148, 163] y biotina [153, 164] como marcadores moleculares. Sin embargo, la conjugación de los LPS presenta algunas dificultades debido a su inercia química, que obstaculizan la obtención de conjugados con alto rendimiento y actividad.

Una de las formas más sencillas de modificar LPS es a través de su oxidación con periodato de sodio, seguido de una etapa de conjugación con una sonda con un grupo hidracida, por ejemplo, biotina-LC-hidracida. Empleando este método, Luk y colaboradores [153] han obtenido conjugados con buena actividad endotóxica; sin embargo con un bajo rendimiento de conjugación. En nuestro grupo, como será descrito en el capítulo 5, se han sintetizado derivados de LPS con biotina por esta misma vía sintética obteniendo un buen grado de derivatización, pero con una modesta actividad endotóxica [164].

Todos estos antecedentes ponen en evidencia la dificultad de obtener un derivado de LPS liso con buen rendimiento conservando su actividad endotóxica. De aquí que el desarrollo de nuevos conjugados en este trabajo de tesis representa un desafío importante. Varias estrategias sintéticas se han evaluado para alcanzar ese objetivo. Los detalles experimentales se discutirán más adelante en los capítulos 5, 6 y 7.

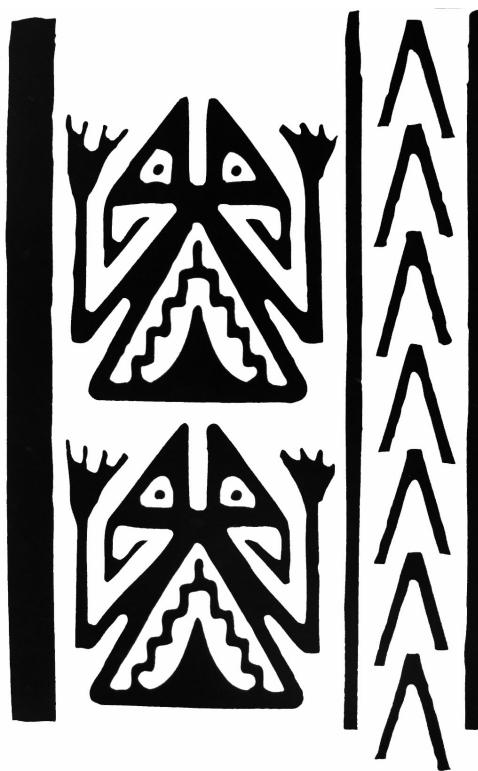
1.6 – Objetivos

En el contexto del desarrollo de un método para la determinación de endotoxinas, este trabajo de tesis tiene el objeto de mejorar las características de los conjugados de LPS, a través de un análisis de sus características químicas. De esta manera se pretende lograr un progreso en la respuesta a endotoxinas en el ensayo

electroquímico competitivo previamente presentado en nuestro grupo de trabajo. En esta tesis también se abordan otros inconvenientes relacionados con el ensayo, tales como la adsorción inespecífica y la reproducibilidad.

Capítulo *2*

Técnicas Empleadas



2.1 – Introducción

Durante la realización de este trabajo de tesis se han empleado una amplia gama de técnicas, que permitieron caracterizar los elementos que constituyen el ensayo competitivo amperométrico para la detección de lipopolisacárido. Entre los elementos mencionados podemos distinguir dos grupos; los conjugados de lipopolisacárido y los elementos que constituyen la plataforma de medición. A continuación se desarrollará una breve descripción del fundamento teórico de las mismas, el tipo de información que brindan, sus ventajas y limitaciones y el tipo de instrumental necesario para su implementación.

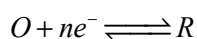
2.2 – Técnicas electroquímicas [165]

2.2.1 – Conceptos generales

En esta tesis se emplearon técnicas de potencial controlado. Estas técnicas requieren el uso de un potenciostato para fijar el potencial y medir la corriente, y de una celda electroquímica, en el caso de este trabajo de tesis, de tres electrodos.

Una reacción de electrodo es un proceso químico heterogéneo que involucra la transferencia de electrones desde o hacia una superficie conductora. Se trata de un proceso anódico si las especies son oxidadas perdiendo electrones; o bien es un proceso catódico si las especies son reducidas en la interfaz, ganando electrones. Las especies electroactivas pueden ser especies disueltas en solución, el solvente mismo, una película sobre la superficie del electrodo o el material del electrodo en sí mismo.

Una reacción de electrodo de la forma general:



involucra una secuencia de pasos que puede incluir el transporte de reactivos hasta la superficie del electrodo, la transferencia de electrones y la remoción del producto de la superficie del electrodo; por lo que la velocidad del proceso estará determinada por la velocidad del paso más lento de la secuencia [166].

2.2.1.1 – Celda electroquímica

Para estudiar una reacción de electrodo comúnmente se emplea una celda que posee tres electrodos. Se denomina *electrodo de trabajo (WE)* a aquel en el cual se producen los cambios electroquímicos de interés. *Electrodo auxiliar* o *contraelectrodo (CE)* a aquel sobre el cual se realiza la medición de corriente del proceso que está ocurriendo en la celda electroquímica (la corriente circula entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo a través de la solución de electrolito). El contraelectrodo debe tener un área mucho mayor que el electrodo de trabajo para evitar la polarización y que la reacción en éste interfiera en la respuesta del electrodo de trabajo. El tercer electrodo es el *electrodo de referencia (RE)* por el que no circula corriente y que sólo controla el potencial del electrodo de trabajo. Para optimizar su función se lo coloca lo más cerca posible del electrodo de trabajo. Con esta configuración se minimiza la caída de potencial, iR , llamada también caída óhmica. Debido a las dimensiones de los electrodos utilizados en esta tesis, los modelos que se describen corresponden al caso de electrodo plano infinito y difusión semi-infinita. Puede encontrarse una discusión más detallada en [165].

2.2.1.2 – Potenciostato

El potenciostato es el instrumento encargado de controlar el potencial entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo. En la actualidad estos dispositivos permiten aplicar distintas funciones de potencial al electrodo de trabajo que generan distintos tipos de respuesta en corriente, siendo la más popular la voltametría cíclica.

Los procesos electroquímicos generalmente no son sencillos, involucran varios pasos que incluyen desde procesos heterogéneos de transferencia de electrones y transporte de masa hasta reacciones químicas homogéneas que pueden estar acopladas, procesos superficiales tales como adsorción, entre otras. Un análisis completo de cualquiera de estos procesos electroquímicos, requiere conocer cada paso individual. Como mínimo es necesario conocer la constante de velocidad estándar, los coeficientes de los procesos que involucran transferencia de electrones, la determinación del número de electrones involucrados y, si hay especies en solución, los correspondientes coeficientes de difusión.

Existe una amplia variedad de técnicas electroquímicas desarrolladas para determinar los parámetros tanto cinéticos como termodinámicos de las reacciones de

electrodo. Dependiendo del sistema químico y de la información que se quiera obtener, se utilizará la técnica adecuada.

En este trabajo de tesis se han empleado principalmente tres técnicas electroquímicas básicas: cronoamperometría, voltametría cíclica y voltametría diferencial de pulso. A continuación se describirá el principio de cada una. Para mayores detalles puede consultarse la bibliografía citada [165, 166].

2.2.2 – Cronoamperometría [167]

La cronoamperometría es una técnica en la cual el potencial del electrodo de trabajo se cambia instantáneamente y se mide la corriente en función del tiempo. En la Figura 2.1 se muestra esquemáticamente la perturbación de potencial aplicada al electrodo de trabajo en función del tiempo.

Para una reacción donde O y R son la especie oxidada y reducida respectivamente, ambas solubles en la solución:

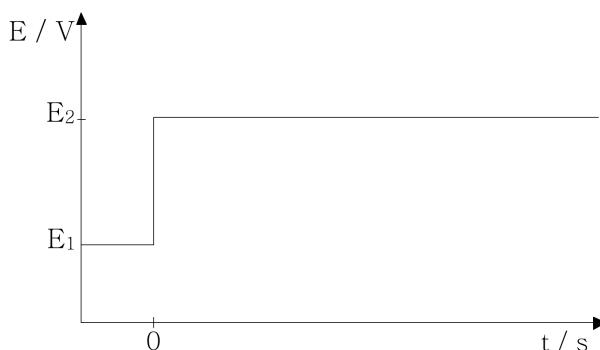
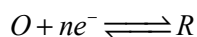


Figura 2.1: Potencial en función del tiempo para un experimento de cronoamperometría.

y E_2 es tal que la reducción de O transcurre a una velocidad controlada por difusión, el proceso queda caracterizado por las leyes de Fick. Imponiendo las condiciones de contorno adecuadas:

- A $t = 0$, $C_O(x, 0) = C_O^*$
- Para $t > 0$, $\lim_{x \rightarrow \infty} C_O(x, t) = C_O^*$
 $C_O(0, t) = 0$

donde C_O^* es la concentración de O en el seno de la solución. Inicialmente ($t = 0$) la concentración de O es uniforme ($C_O = C_O^*$), luego de aplicada la perturbación, la concentración de O se agota sobre la superficie del electrodo y en todo momento $C_O = C_O^*$ lejos del electrodo (difusión lineal semi infinita). Las ecuaciones pueden ser resueltas aplicando la transformada de Laplace a la expresión correspondiente a la segunda ley de Fick, pudiéndose obtener las expresiones para el perfil de concentración de la especie O en función del tiempo y de la distancia. La dependencia de la corriente con el tiempo viene dada por:

$$i = nFAD_0 \left[\frac{\partial C_0}{\partial x} \right]_{x=0} \quad (2.1)$$

que lleva a la respuesta cronoamperométrica conocida como la ecuación de Cottrell:

$$i = \frac{nFAD_0^{1/2} C_0^*}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \quad (2.2)$$

donde i es la intensidad de corriente, n el número de electrones intercambiados en la reacción, A es el área del electrodo, D_O es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva, en este caso O , F la constante de Faraday y t el tiempo. Esta ecuación relaciona la corriente i con $t^{-1/2}$. A partir de un gráfico de i vs. $t^{-1/2}$ puede obtenerse el coeficiente de difusión de la especie O .

La forma del transitorio de corriente depende del tipo de proceso que esté controlando la velocidad de la reacción de electrodo. En la Figura 2.2 se muestran distintos tipos de transitorios posibles.

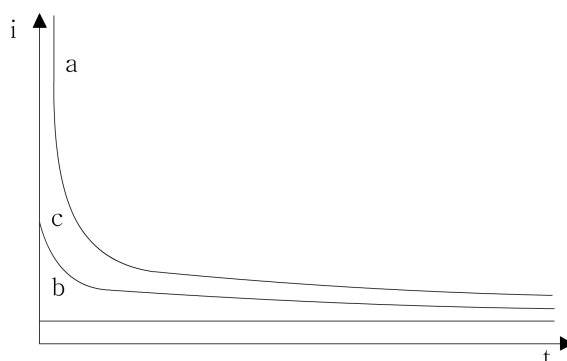


Figura 2.2: Corriente vs. tiempo para experimentos de salto de potencial. a) Control difusional, b) control cinético, c) control mixto.

Cuando la reacción está controlada por difusión, se tiene una respuesta corriente-tiempo según la curva *a*. Cuando la reacción está controlada cinéticamente la respuesta de corriente es del tipo representado en la curva *b*, esto ocurre cuando la constante de la velocidad de la reacción es pequeña (o cuando el valor de E_2 impone un sobrepotencial muy bajo para la reacción), entonces la concentración de la especie *O* no cambia de manera significativa ya que el sobrepotencial aplicado no es muy grande y por lo tanto la difusión no juega un rol muy importante para determinar la velocidad de la reacción. En una situación intermedia entre los casos *a* y *b* tenemos el transitorio correspondiente a la curva *c* en la cual la velocidad de transferencia de carga y la velocidad de difusión son comparables y la corriente cae en el tiempo, pero de una manera más suave, se dice que el sistema se encuentra bajo control mixto.

2.2.3 – Voltametría cíclica [168]

Por su sencillez, la voltametría cíclica (VC) ha sido una de las técnicas electroquímicas más utilizadas y conocidas para la exploración preliminar de un sistema electroquímico. A partir del barrido lineal del potencial en función del tiempo es posible mostrar a que potenciales ocurren los procesos redox, detectar reacciones químicas acopladas, estimar velocidades de reacción, tanto en la superficie del electrodo como en solución, y hasta es posible identificar fenómenos de adsorción. En la Figura 2.3 se muestra la forma en la que puede variarse el potencial aplicado al electrodo de trabajo en función del tiempo.

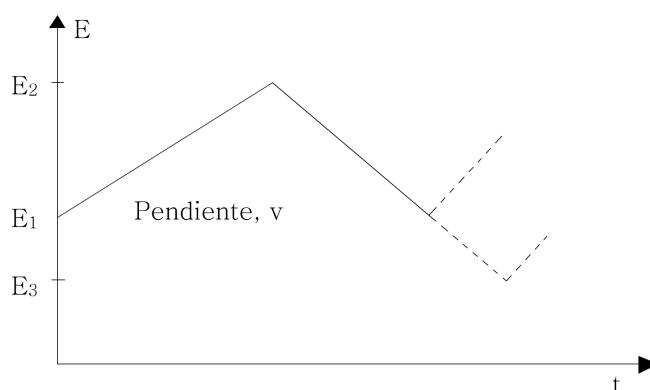


Figura 2.3: Perfil de potencial en función del tiempo para voltametría cíclica.

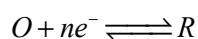
La velocidad de barrido usada generalmente se encuentra entre los pocos mV/s hasta 100 V/s. La respuesta en corriente se grafica en función del potencial y el eje de

potencial es también un eje de tiempo. Dependiendo de la forma de la VC se podrá saber si se trata de una reacción reversible, irreversible o si se trata de una especie adsorbida electroquímicamente activa. Otras respuestas características se obtienen cuando existen reacciones químicas acopladas al proceso de transferencia de carga.

En este trabajo de tesis solo se trabajó con especies electroquímicas en solución, razón por la cual se centrará la explicación de la técnica a este caso particular.

2.2.3.1 – Especie electroquímica en solución

Nuevamente, se considera el proceso:



En el marco del análisis de la curva i vs. E , la corriente depende del control cinético y difusional, observándose un crecimiento de la misma a medida que el sobrepotencial de la cupla aumenta, llegando a una corriente pico cuando la reacción comienza a estar controlada por difusión. Esta corriente pico es un parámetro característico de la voltametría. En la Figura 2.4 se observa el voltamograma cíclico obtenido para una reacción reversible de transferencia de $1 e^-$, donde la especie electroquímica se encuentra en la solución. Si el potencial se barre a través del intervalo donde se produce la reacción de oxidación ($R \rightarrow O$), inicialmente y como consecuencia del cambio en el potencial aplicado, la oxidación de R en la superficie se ve favorecida y por lo tanto la densidad de corriente anódica aumenta. Esta densidad de corriente continúa aumentando hasta que la concentración superficial llega a ser cero y por lo tanto la reacción pasa a estar controlada por difusión. Como la concentración superficial se mantiene en cero, y con el tiempo el flujo hacia la superficie disminuye, la densidad de corriente disminuye, y por consiguiente la respuesta presenta un pico. Para el barrido de vuelta, la reacción de transferencia electrónica en el electrodo es $O \rightarrow R$, por lo tanto la corriente cambiará su signo. La corriente catódica pasará de nuevo a través de un pico, en un proceso similar al descrito anteriormente.

La respuesta de la voltametría cíclica para una reacción de transferencia electrónica de una especie en solución puede modelarse teniendo en cuenta la velocidad de reacción de la especie electroactiva en la superficie del electrodo, su difusión y las posibles reacciones acopladas en el seno de la solución [169]. El modelo predice que la forma de la curva es independiente de la velocidad de barrido de potencial para una

especie reversible. El análisis de la voltametría cíclica puede conducir a obtener parámetros termodinámicos y el coeficiente de difusión.

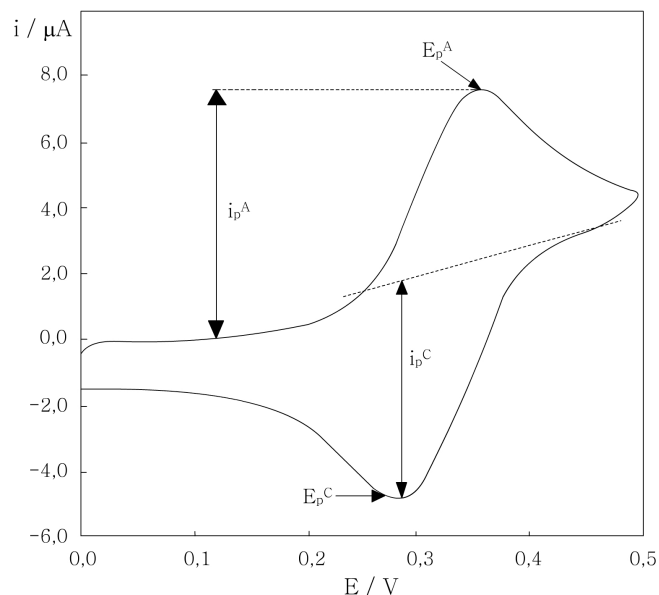


Figura 2.4: Voltametría cíclica para un proceso reversible. E_p^C y E_p^A corresponden a los potenciales de pico catódico y anódico respectivamente. i_p^C e i_p^A son las corrientes de pico catódico y anódico.

Para el caso de una especie que reacciona muy rápido con la superficie de un electrodo (caso reversible), el potencial formal para la cupla se encuentra a partir de:

$$E_{O/R}^{0'} = \frac{(E_p^A + E_p^C)}{2} \quad (2.3)$$

donde E_p representa el potencial de la corriente pico y los superíndices A y C a los procesos anódicos y catódicos, respectivamente.

Mientras que el coeficiente de difusión se puede determinar a partir de graficar la corriente pico, i_p , versus la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, ν , utilizando la ecuación de Randles-Sevcik, escrita a 298K,

$$i_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D_R^{1/2} \nu^{1/2} C_R^* \quad (2.4)$$

donde la corriente de pico, i_p tiene la unidad Ampere (A), el área del electrodo, A (cm^2), la concentración de la especie electroactiva en el seno de la solución, C_R^* (mol cm^{-3}), el coeficiente de difusión, D_R ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) y la velocidad de barrido de potencial, ν (V s^{-1}).

A partir de la forma del voltamograma experimental se puede comprobar la reversibilidad del sistema. Para una cupla reversible, se cumple que:

- $\Delta E_p = E_p^A - E_p^C = 59/n \text{ mV}$
- $-j_p^C = j_p^A$
- i_p proporcional a $v^{1/2}$
- E_p independiente de v

2.2.4 – Voltametría diferencial de pulso [170]

En la voltametría diferencial de pulso (DPV) el barrido de potencial no se realiza de forma lineal como se ha descrito para la voltametría cíclica, sino que se aplica un perfil caracterizado por pulsos de potencial de baja amplitud como lo muestra el esquema de la Figura 2.5.

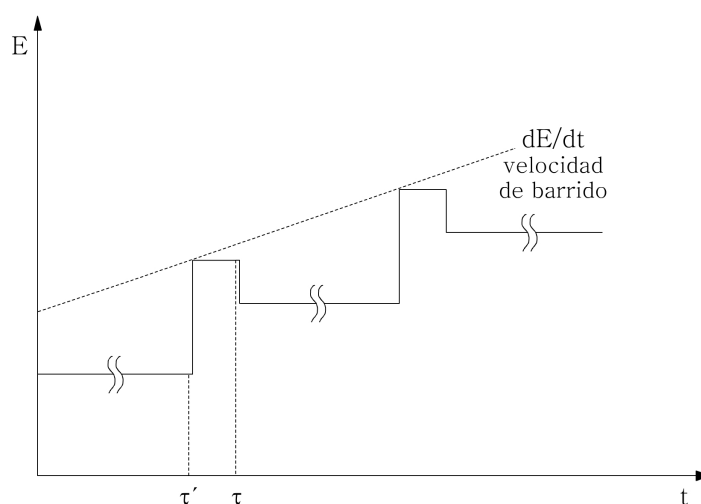


Figura 2.5: Programa de potencial en un experimento de voltametría diferencial de pulso.

En esta técnica se toman dos medidas de corriente por cada pulso de potencial aplicado. Uno a tiempo τ' , inmediatamente antes del pulso, y el segundo a tiempo τ , justo antes de la finalización del pulso. En esta última medición, la corriente capacitiva, correspondiente a la carga de la doble capa, ya habrá caído esencialmente a cero (Figura 2.6), haciendo que la corriente medida sea netamente faradaica. De esta forma, la técnica gana sensibilidad respecto de las técnicas no pulsadas (Figura 2.7). El registro del experimento corresponde a un gráfico de la diferencia de corriente, $\delta i = i(\tau) - i(\tau')$, versus el potencial base, E .

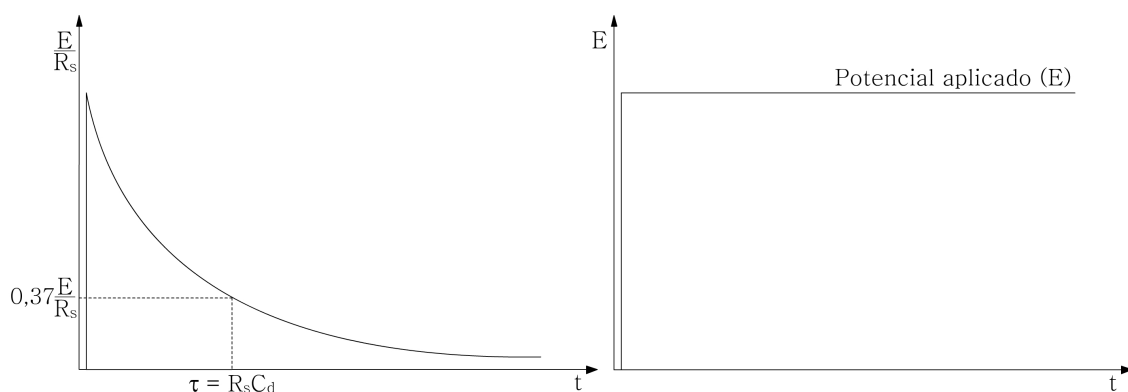


Figura 2.6: Decaimiento de la corriente de carga de la doble capa tras la aplicación de un pulso de potencial.

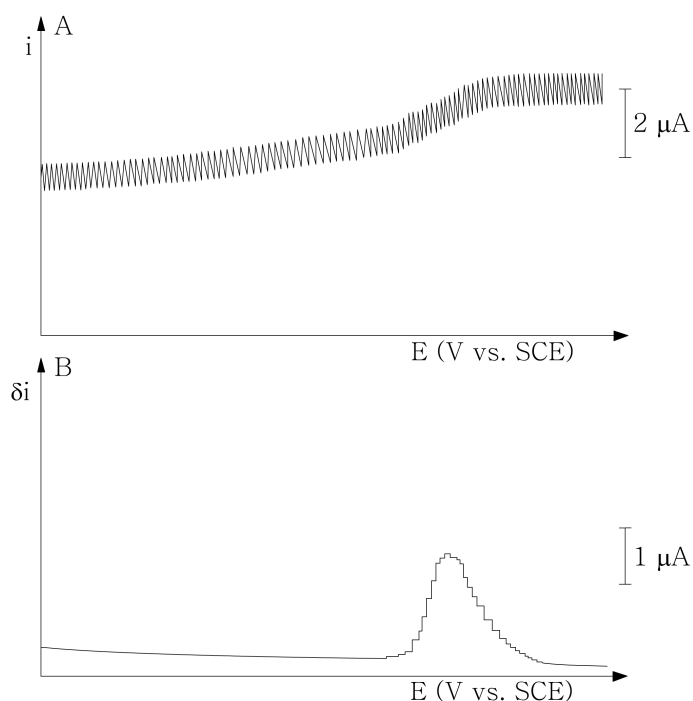


Figura 2.7: Voltametría de Cd^{2+} 10^{-4} M en HCl 0,1 M. A) Modo convencional de barrido lineal. B) Modo de barrido por pulso diferencial, $\Delta E = 50$ mV [170].

La forma de la función respuesta y la altura del pico pueden tratarse cuantitativamente. Desde $t = 0$ hasta la aplicación del pulso de potencial a $t = \tau'$, el potencial corresponde al potencial base E . A mayores tiempos, el potencial es $E + \Delta E$, donde ΔE corresponde a la altura del pulso. El período de preelectrólisis τ' típicamente es entre 20 y 100 veces mayor que la duración del pulso $\tau - \tau'$. De esta forma, la preelectrólisis establece una capa difusional gruesa, y el pulso solo es capaz de

modificar una pequeña parte de este. De hecho, el experimento puede aproximarse asumiendo que el pulso no distingue el perfil de concentración al inicio de aquel correspondiente a la concentración del seno de la solución. En consecuencia, el rol de la preelectrólisis es establecer la condición de “concentración aparente del seno de la solución” en la cercanía del electrodo.

Considerando el proceso ($O \rightarrow R$) un sistema nernstiano, donde R inicialmente no existe, las concentraciones superficiales durante la preelectrólisis, a un potencial E , están dadas por:

$$C_O(0,t) = C_O^* \left[\frac{\varepsilon \theta}{1 + \varepsilon \theta} \right] \quad C_R(0,t) = C_O^* \left[\frac{\varepsilon}{1 + \varepsilon \theta} \right] \quad (2.5)$$

donde $\theta = \exp[nF/RT(E - E^{0'})]$. Se consideran a estos valores como las concentraciones aparentes del seno de la solución $(C_O^*)_{ap}$ y $(C_R^*)_{ap}$ para el pulso. Dado que el sistema es nernstiano, y $(C_O^*)_{ap}$ y $(C_R^*)_{ap}$ están en equilibrio con E , puede hallarse la corriente faradaica luego de un pulso desde el equilibrio a $E + \Delta E$ en un medio homogéneo de concentraciones $(C_O^*)_{ap}$ y $(C_R^*)_{ap}$.

Mediante un tratamiento similar al aplicado en la obtención de la ecuación 2.2 puede hallarse la siguiente expresión para la corriente:

$$i = \frac{nFAD_O^{1/2}C_O^*}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \left[\frac{P_A(1-\sigma^2)}{(\sigma + P_A)(1 + P_A\sigma)} \right] \quad (2.6)$$

donde

$$P_A = \xi \exp \left[\frac{nF}{RT} \left(E + \frac{\Delta E}{2} - E^{0'} \right) \right] \quad (2.7)$$

$$\sigma = \exp \left[\frac{nF}{RT} \frac{\Delta E}{2} \right] \quad (2.8)$$

a partir de esta expresión, el diferencial de corriente faradaica $\delta i = i(\tau) - i(\tau')$ queda determinado por:

$$\delta i = \frac{nFAD_O^{1/2}C_O^*}{\pi^{1/2}(\tau - \tau')^{1/2}} \left[\frac{P_A(1-\sigma^2)}{(\sigma + P_A)(1 + P_A\sigma)} \right] \quad (2.9)$$

El factor entre barras describe δi como una función del potencial. Cuando E es mucho más positivo que $E^{0'}$, P_A es grande y δi es prácticamente cero. Cuando E es mucho más negativo que $E^{0'}$, P_A se aproxima a cero, y así lo hace δi . De la derivada $d(\delta i)/dP_A$ puede demostrarse que δi se maximiza para $P_A = 1$, lo que implica que:

$$E_{m\acute{a}x} = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \left[\frac{D_R}{D_O} \right]^{1/2} - \frac{\Delta E}{2} = E^{1/2} - \frac{\Delta E}{2} \quad (2.10)$$

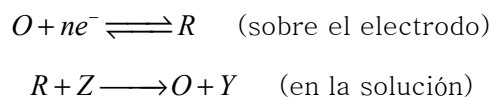
La altura del pico está dada por:

$$(\delta i)_{m\acute{a}x} = \frac{nFAD_o^{1/2}C_o^*}{\pi^{1/2}(\tau - \tau')^{1/2}} \left[\frac{1 - \sigma}{1 + \sigma} \right] \quad (2.11)$$

donde el cociente $(1 - \sigma)/(1 + \sigma)$ disminuye monótonamente con la disminución de $|\Delta E|$ y alcanza el valor cero para $\Delta E = 0$. Cuando ΔE es negativo δi es positivo (o catódico), y viceversa.

2.2.5 – Reacción catalítica acoplada

En este trabajo de tesis se utiliza peroxidasa de rábano picante (HRP) como sonda para llevar a cabo el ensayo de detección de LPS. Esta enzima no reacciona eficientemente de manera directa con la superficie de un electrodo [171, 172] y por lo tanto es necesario emplear un mediador redox. En presencia del sustrato de la enzima, la situación que se presenta corresponde a una reacción sobre el electrodo acoplada a una reacción catalítica como indica el esquema:



En esta situación, el producto de la reacción de electrodo, R , reacciona con una especie generalmente no electroactiva para regenerar O . El problema podría involucrar la consideración de una reacción de segundo orden y la difusión de la especie Z . En el tratamiento más sencillo, se asume que la concentración de Z se mantiene constante durante el experimento, y por lo tanto puede considerarse una reacción de pseudo primer orden. Un tratamiento teórico detallado para el caso en que todas las especies se encuentran en solución puede encontrarse en literatura [128, 173].

En este trabajo de tesis, la especie Z corresponde a la enzima HRP, la cual se halla inmovilizada sobre el electrodo, mientras que el mediador redox se encuentra en solución. La Figura 2.8 muestra un esquema de esta situación, donde el mediador redox corresponde a un complejo de osmio (ver detalles en los capítulos 4 y 8).

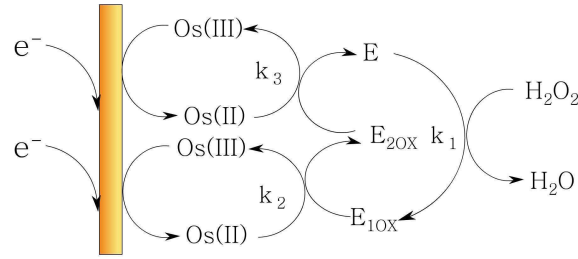
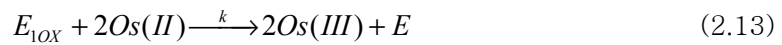
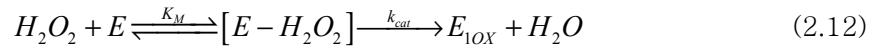


Figura 2.8: Conexión del sistema enzimático de HRP con un electrodo.

En el esquema, E representa la enzima nativa, E_{10X} y E_{20X} son los estados oxidados de la enzima. El primer paso (k_1) corresponde a la oxidación de la enzima por el H_2O_2 reduciéndose a H_2O , quedando la enzima como E_{10X} . En un segundo paso (k_2), E_{10X} es reducido por $Os(II)$ al intermediario E_{20X} . Finalmente, E_{20X} es reducido (k_3) por otra molécula de $Os(II)$ a la forma nativa de la enzima, E . El $Os(III)$ producido en estos procesos se reduce a $Os(II)$ sobre la superficie del electrodo, dando lugar a una corriente catódica. El ciclo catalítico puede resumirse con las siguientes ecuaciones:



donde K_M es la constante de asociación bimolecular enzima-sustrato y k_{cat} es la constante de velocidad de la reacción de catálisis. Ambas constantes están agrupadas en la constante k_1 (Figura 2.8). Las constantes k_2 y k_3 están resumidas en la ecuación 2.13 como k . k' es la constante de velocidad de transferencia de electrones entre el mediador oxidado y la superficie del electrodo.

Bartlett y colaboradores [174] desarrollaron un modelo para describir la respuesta de estado estacionario de un electrodo cubierto por una película delgada conteniendo una enzima inmovilizada. El electrodo se fija a un potencial de modo que el proceso de reducción de $Os(III)$ a $Os(II)$ está controlado por transporte de masa. Además se asume que no hay $Os(III)$ en el seno de la solución. Considerando que el espesor de la película es lo suficientemente delgado de modo que no hay gradiente de concentración ni de H_2O_2 u $Os(II)$ dentro de la película, a alta concentración de sustrato H_2O_2 (sin llegar a concentraciones inhibitorias) y bajas concentraciones de mediador $Os(II)$, la cinética de la reacción global queda controlada por la velocidad de reducción de la enzima E_{10X} por el mediador. La expresión para la corriente es:

$$i = nFAkK_{Os(II)}[Os(II)]^*[E_{\Sigma}]l \quad (2.15)$$

donde $K_{Os(II)}$ es el coeficiente de partición para Os(II) entre la película y el seno de la solución; $[Os(II)]^*$ la concentración de Os(II) en el seno de la solución; $[E_{\Sigma}]$ es la concentración total de la enzima dentro de la película, y l es el espesor de la película.

En estas condiciones, la reacción 1 (Figura 2.8) es más rápida que aquellas que involucran al mediador, siendo la reacción 3 el paso determinante de la velocidad [175]. Dado que se trata de una película delgada, el producto $[E_{\Sigma}]l$ puede reemplazarse en la ecuación 2.15 por la concentración superficial de la enzima, $\Gamma_{E_{\Sigma}}$. Luego, considerando la constante de partición del mediador igual a 1, se obtiene:

$$i = nFAk_3[Os(II)]^*\Gamma_{E_{\Sigma}} \quad (2.16)$$

Este modelo permite evaluar la respuesta electroquímica de sistemas basados en enzimas inmovilizadas. Como se verá en el capítulo 4 y en el capítulo 8, a partir de mediciones cronoamperométricas puede conocerse el cubrimiento enzimático pudiendo obtener información respecto del comportamiento del electrodo modificado.

2.3 – Espectrometría de desorción/ionización por láser asistida por una matriz [176–178]

Los métodos convencionales de espectrometría de masas, impacto de electrones (EI), ionización química (CI) o ionización por campo (FI), requieren que los agentes de ionización actúen sobre muestras gaseosas. Tales métodos no son aplicables a muestras no volátiles o térmicamente inestables. En las últimas dos décadas se han desarrollado numerosos métodos de ionización por desorción para tratar este tipo de muestras. Entre ellas podemos citar: desorción por campo (FD), ionización por electronebulización (ESI), desorción/ionización asistida por una matriz (MALDI) entre otras. Como consecuencia, actualmente se puede obtener información sobre espectros de masas de especies bioquímicas térmicamente delicadas y especies que tienen masas moleculares superiores a los 10000 daltons [179].

Los métodos de desorción prescinden de la volatilización y posterior ionización de la molécula de analito. En su lugar, se suministra energía a la muestra sólida o líquida de diversas maneras, de modo que se provoca la formación directa de iones gaseosos. Como consecuencia, se obtienen espectros muy simplificados y a menudo consisten sólo en el ión molecular o el ión molecular protonado.

La espectrometría de desorción/ionización por láser asistida por una matriz es un método de ionización que permite obtener información sobre las masas moleculares exactas de biopolímeros polares en un intervalo de masas moleculares de algunos miles a varios cientos de miles de daltons.

Matriz	Longitud de onda (nm)
Ácido nicotínico	266, 220–290
Derivados del ácido benzoico:	
Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	266, 337, 355
Ácido vanílico	266
Ácido 2-aminobenzoico	266, 337, 355
Ácido pirazinacarboxílico	266
Ácido 3-aminopirazina-2-carboxílico	337
Derivados del ácido cinámico:	
Ácido ferúlico	266, 377, 355
Ácido sinapínico	266, 377, 356
Ácido cafeico	266, 377, 357
Alcohol 3-nitrobencílico	266

Tabla 2.1: Matrices de uso más frecuente en MALDI, junto con las longitudes de onda utilizadas.

En la técnica se mezcla una disolución acuosa/alcohólica de la muestra con un gran exceso de una sustancia matriz que absorbe la radiación, tal como alguna de las relacionadas en la Tabla 2.1. La disolución resultante se evapora en la superficie de una sonda metálica que se utiliza para la introducción de la muestra. La mezcla sólida se expone a la acción de un haz de láser pulsante, provocándose la sublimación del analito a iones que son introducidos en un espectrómetro de tiempo de vuelo (TOF) para el análisis de masas. Básicamente, en el analizador de tiempo de vuelo, los iones generados por láser son acelerados en un tubo analizador libre de campo mediante un campo eléctrico pulsante de 10^3 a 10^4 V (Figura 2.9). La separación de los iones en función de la masa se produce durante su recorrido hasta el detector, situado al final del tubo. Dado que todos los iones de la misma carga que entran en el tubo tienen la misma energía cinética (depende del potencial aplicado entre las rendijas de aceleración), sus velocidades en él variarán inversamente a sus masas (Ecuación 2.17), y por lo tanto las partículas más ligeras llegarán antes al detector que las pesadas. Los tiempos de vuelo

característicos están entre 1 y 30 μs . Una descripción más detallada del analizador puede encontrarse en la referencia [176].

$$EC = zeV = \frac{1}{2}mv^2 \quad (2.17)$$

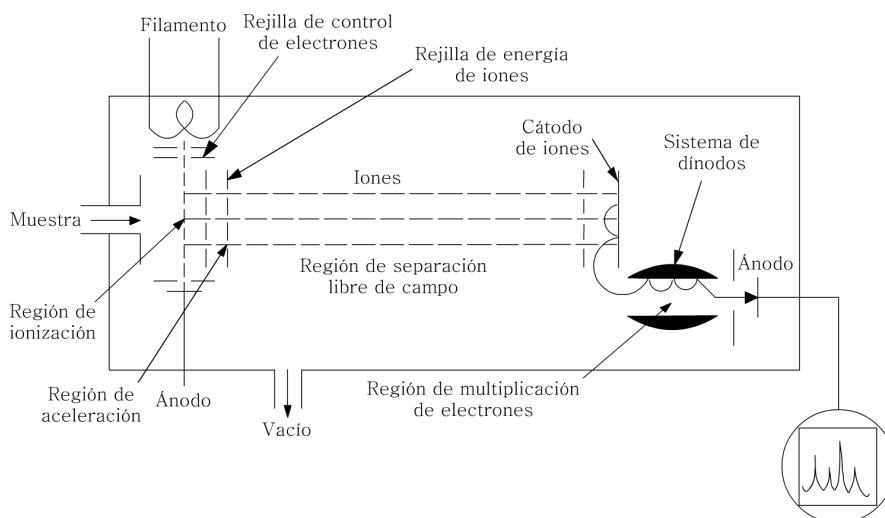


Figura 2.9: Esquema de un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo.

El intervalo de tiempo entre los pulsos del láser es tal que el espectro completo puede registrarse durante el intervalo que hay entre los pulsos. La Figura 2.10 muestra un espectro de MALDI para albúmina de suero bovino (BSA) con una masa molecular de aproximadamente 66000 daltons. El espectro se caracteriza por la ausencia de fragmentaciones del ión analito. Obsérvese asimismo que aparecen iones de carga múltiple.

Una molécula naturalmente posee energía rotacional, vibracional y electrónica, y energía cinética de movimiento si se trata de un líquido o un gas. Bajo muchas circunstancias cotidianas, si la molécula o grupo de moléculas aumentan su energía interna durante un período “relativamente” largo de tiempo, las moléculas vuelven a su estado de equilibrio por disipación del exceso de energía al medio circundante sin causar cambios en su estructura molecular. Superada una cierta cantidad de energía en un período de tiempo muy corto, la energía no puede ser disipada lo suficientemente rápido y consecuentemente la sustancia se funde y vaporiza por conversión de la energía interna vibracional y rotacional en traslacional; simultáneamente, la excitación electrónica puede ser lo suficientemente grande para expulsar electrones de la molécula para dar iones. De esta forma, la imposición de una elevada energía en un sistema

molecular durante un período de tiempo corto puede causar su vaporización, posible destrucción y, lo más importante para espectrometría de masas, su ionización.

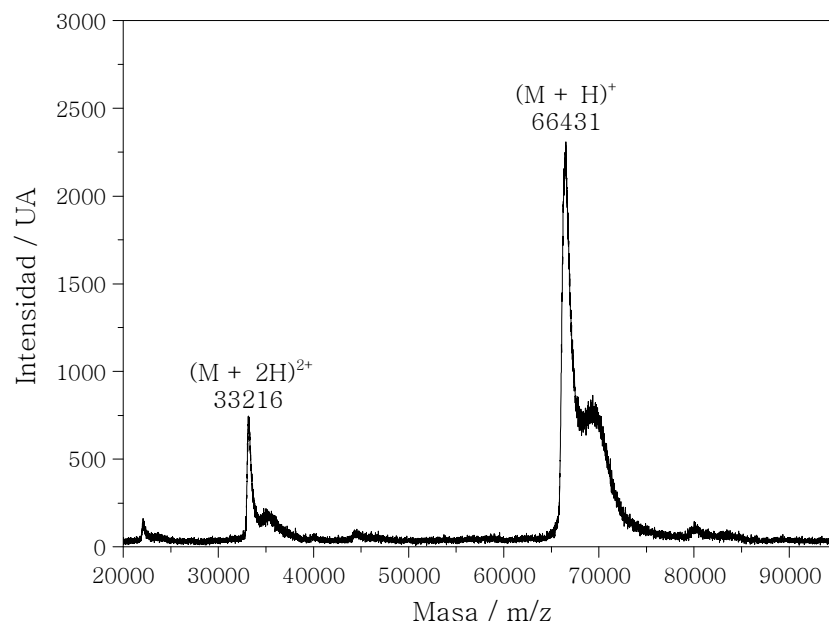


Figura 2.10: Espectro MALDI con una matriz de ácido sinapínico irradiada a 337 nm.

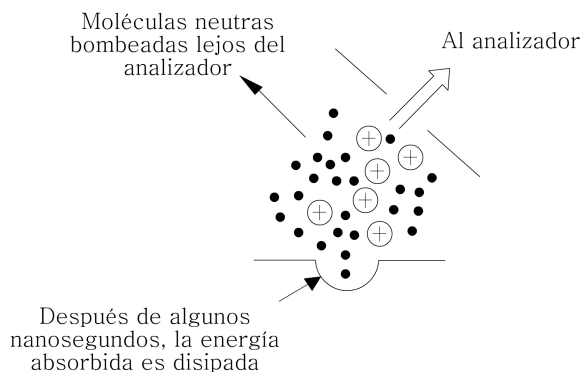


Figura 2.11: Esquema de desorción/ionización del analito tras el pulso láser.

En espectrometría MALDI es la fuente láser la que proporciona a la muestra una gran densidad de energía en un pequeño espacio. La sustancia matriz, que posee una banda de absorción que coincide con la energía de radiación del láser, rápidamente aumenta su energía y transfiere parte de esa energía al analito causando su desorción y ionización (Figura 2.11). Si bien, es aceptado en la comunidad científica que el proceso de desorción y ionización es mediado por la formación de “clusters” altamente cargados que dan lugar a los iones de los analitos por captura electrónica y transferencia de protones [180, 181], el mecanismo no ha sido completamente elucidado. En los últimos

años se han publicado varios trabajos en relación a la dinámica de desorción/ionización [182-184].

Las propiedades que un compuesto requiere para ser una matriz adecuada tampoco son del todo conocidas. Estudios empíricos muestran que el compuesto matriz debe absorber fuertemente la radiación láser y debe ser suficientemente soluble en el disolvente de la muestra como para que haya un gran exceso en la mezcla depositada en la sonda.

En este trabajo de tesis la espectrometría MALDI-TOF se utiliza para caracterizar los derivados de peroxidasa de rábano picante sintetizados en los capítulos 6 y 7. El procedimiento experimental se encuentra detallado en la sección 3.5.2.

2.4 – Ensayos competitivos [113, 185-188]

2.4.1 – Curva de competencia

En un ensayo competitivo se mide la unión de una única concentración de analito marcado o conjugado en la presencia de concentraciones variables de analito libre o sin marcar. Típicamente la concentración de analito varía sobre varios órdenes de magnitud. Las curvas que se obtienen, tienen forma sigmoidea y son denominadas curvas de competencia o curvas de dosis-respuesta (Figura 2.12).

En la curva se observan dos plateaus: el superior, a un valor correspondiente a la señal proveniente al conjugado unido al receptor, en ausencia de su competidor, el analito sin marcar y el inferior a un valor correspondiente a la señal de la unión inespecífica. La concentración de analito que reduce la señal al 50 % del valor de la asíntota superior (Figura 2.12) se denomina IC_{50} (Concentración Inhibitoria 50 %) y constituye una estimación, tanto de la afinidad del anticuerpo ó receptor hacia el analito, como de la sensibilidad del método. Si el conjugado y el analito se unen ambos reversiblemente a un único sitio de unión, la señal debida a la unión del analito al receptor en el equilibrio en función de la concentración de analito sin marcar sigue la siguiente ecuación:

$$y = \frac{(A-D)}{\left[1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right]} + D \quad (2.18)$$

donde A es el valor de la asíntota superior, B es la pendiente de la curva en el punto de inflexión, C es la concentración de analito en el punto de inflexión y D es el valor de la asíntota inferior. El parámetro C , en la práctica corresponde a la IC_{50} .

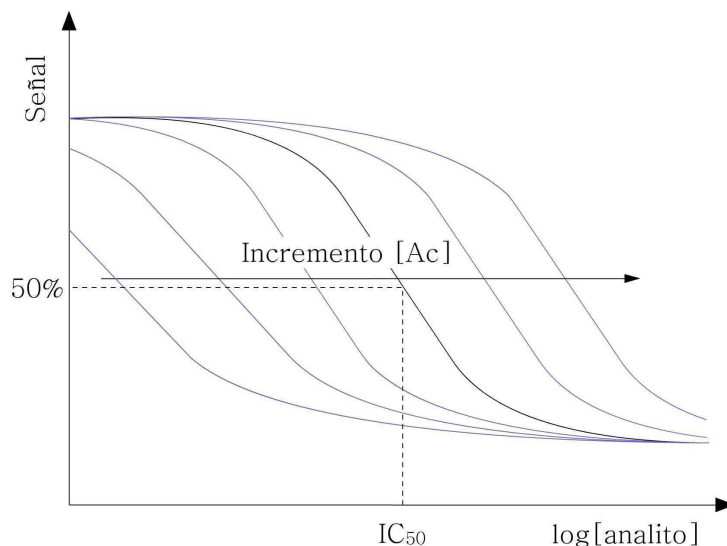


Figura 2.12: Curva dosis-respuesta estándar típica en un ensayo competitivo. Con línea punteada se indica la IC_{50} . Las curvas en azul muestran el efecto en el cambio de la concentración de receptor ($K_d = 10^{-10} \text{ M}^{-1}$).

La IC_{50} puede estar influenciada por 3 factores:

- La afinidad del receptor por el analito, que está reflejada en su constante de disociación, K_d . Si la afinidad es alta (por lo tanto K_d es pequeña), el valor de IC_{50} será bajo.
- La concentración de conjugado. Cuanto mayor sea la concentración de conjugado elegida, mayor concentración de analito se necesitará para que compitan por la unión.
- La afinidad del conjugado por el receptor. Se necesita más analito para competir con un conjugado que puede unirse fuertemente (K_d pequeña) que para uno que puede unirse más débilmente (K_d grande). En este último caso, se necesitará también una mayor concentración de conjugado para poder obtener una señal aceptable.

2.4.2 – Unión inespecífica

Además de unirse al anticuerpo o receptor, el conjugado puede unirse a otros sitios que se denominan sitios inespecíficos. La señal obtenida para la unión inespecífica puede obtenerse midiendo la unión del conjugado en la presencia de una concentración elevada de analito tal que sature al receptor. Bajo esas condiciones, se asume que todos los receptores son ocupados por el analito, de manera tal que el conjugado solo puede unirse a los sitios inespecíficos.

Factores que afectan la calidad del ensayo:

- La constante de equilibrio, K_{eq} .
- La precisión en la medida de la señal.
- El nivel de unión inespecífica. Si la unión inespecífica es elevada, se requerirá mayor cantidad de anticuerpo (o receptor) para aumentar el porcentaje de conjugado unido y así incrementar la relación señal específica/señal inespecífica.

Un problema a tener en cuenta en un ensayo competitivo es que la marcación del analito, para la obtención del conjugado puede afectar la capacidad de unión con el receptor, particularmente si la conjugación involucra la región crítica o específica para la unión.

2.5 – Instrumentación

2.5.1 – Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas se llevaron a cabo utilizando distinta instrumentación de acuerdo a los requerimientos de cada procedimiento y los sistemas en cuestión. Para aquellos procedimientos que involucraron láminas de oro de 1 cm^2 de área geométrica como electrodos de trabajo se empleó un potenciostato TEQ 02. En estos casos se empleó una celda de vidrio convencional de tres electrodos utilizando un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia y una malla de platino como contraelectrodo.

Para los experimentos de voltametría diferencial de pulso se utilizó un potenciostato μ AUTOLAB type III con la misma celda de vidrio con un electrodo de carbono vítreo de $0,07\text{ cm}^2$ de área.

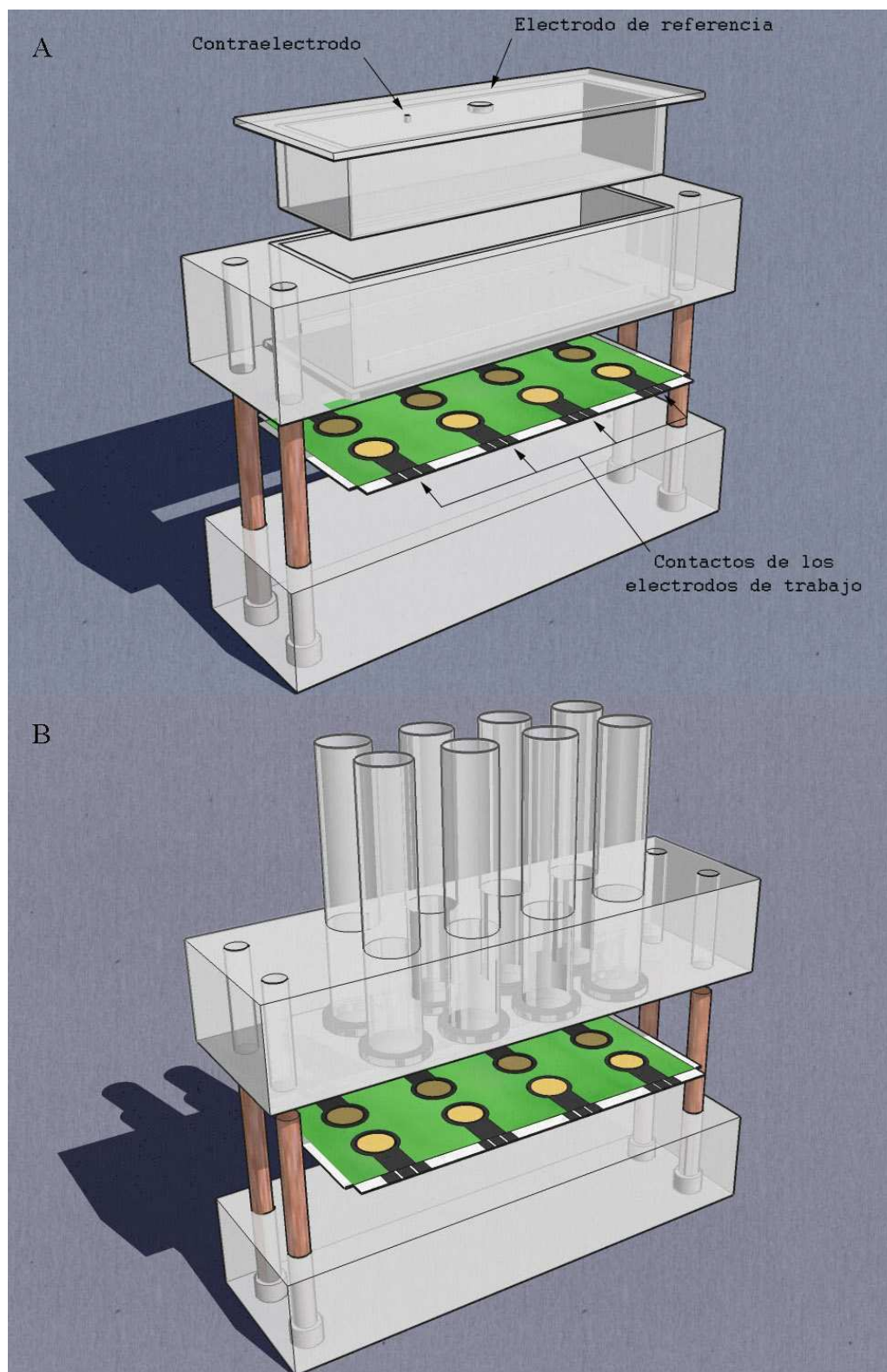


Figura 2.13: Esquema de las celdas de acrílico empleadas en el sistema multielectrodos. A) Celda de medición y de depósito galvanostático de oro. Con flechas se indican los contactos de los electrodos de trabajo, la posición donde se ubica el electrodo de referencia y el contraelectrodo. B) Celda de modificación diferencial de electrodos.

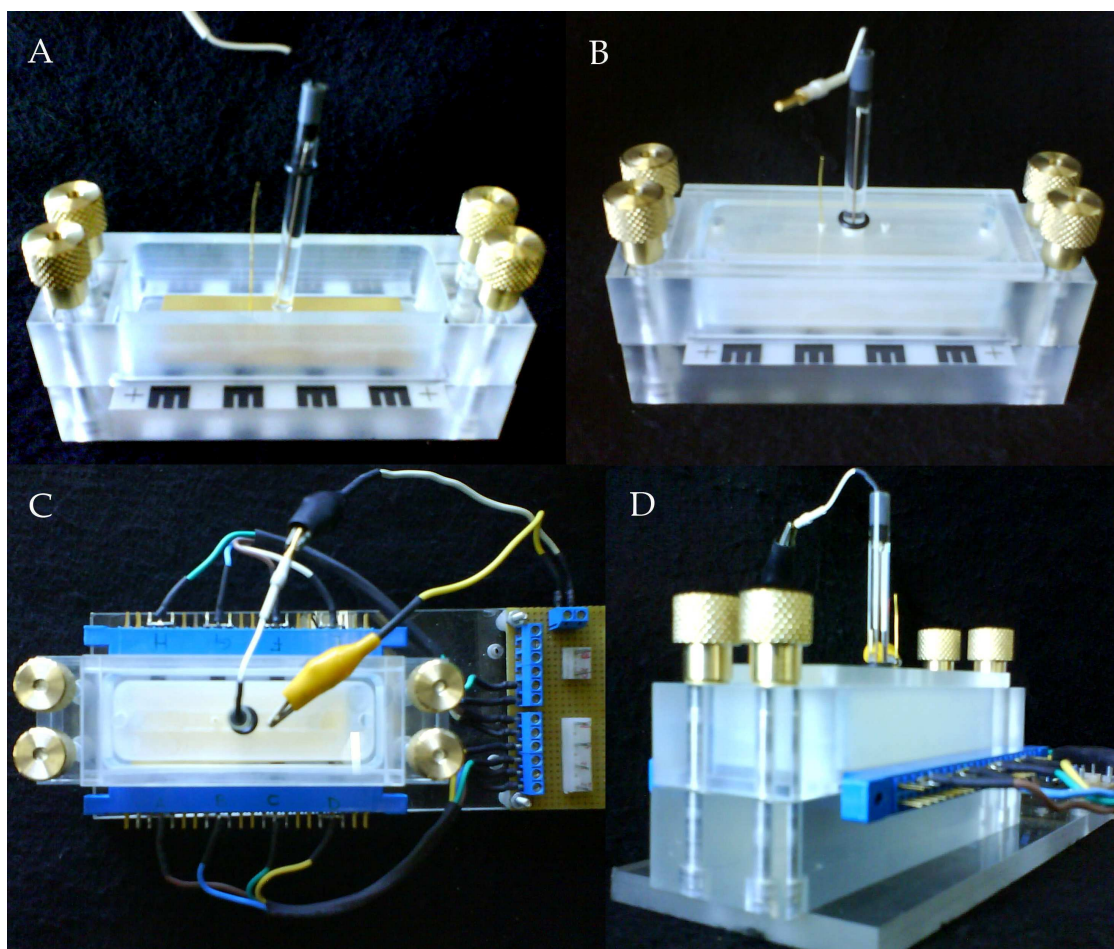


Figura 2.14: Fotos de la celda empleada en las mediciones y en el depósito galvanostático de oro. A y B) Ubicación del electrodo de referencia y contraelectrodo sin y con la tapa, respectivamente. C y D) Vista superior y perspectiva de la celda montada sobre la base de conectores, respectivamente.

El depósito galvanostático de oro sobre la plataforma de multielectrodos se llevó a cabo empleando un galvanostato/potenciostato marca PINE Modelo AFRDE5 de acuerdo a lo descrito en la sección 3.6. La limpieza de estos electrodos se realizó por ciclado electroquímico en ácido perclórico utilizando un potenciostato μ AUTOLAB type III (sección 3.6.1) tratando a un electrodo por vez. Las mediciones sobre la plataforma de multielectrodos se llevaron a cabo con un multipotenciostato MultiTEQ. La Figura 2.13 A muestra el diseño y el armado de la celda utilizada en la deposición electroquímica de oro y en todas aquellas medidas electroquímicas involucradas en el sistema multielectrodos. El desarrollo de esta celda fue implementado, en nuestro grupo de trabajo, en conjunto con el del arreglo de electrodos según lo comunicado en [189]. Como electrodo de referencia se utiliza un electrodo de Ag/AgCl y como

contraelectrodo una placa de oro de 78 x 28 x 0,2 mm (longitud x ancho x espesor) que se ubica a 5 mm por encima de los electrodos de trabajo (Figura 2.14).

Esta misma celda se utiliza para llevar a cabo la modificación de los electrodos cuando deba aplicarse el mismo tratamiento a cada uno de ellos. En los casos donde cada electrodo necesite un tratamiento diferente al vecino otro modelo de celda es empleado (Figura 2.13 B). En este último, cada tubo, ubicado por encima del electrodo de trabajo, puede llenarse con distintas soluciones conforme sea necesario para el paso de modificación en cuestión. Un ejemplo de ello es el uso de distintas concentraciones de lipopolisacárido en el procedimiento correspondiente al ensayo competitivo que se describirá más adelante en el capítulo 8.

2.5.2 – Espectrometría de desorción/ionización por láser asistida por una matriz

El análisis se llevó a cabo utilizando un espectrómetro de masa Bruker modelo OmniFLEX Daltonics. El equipo opera con un láser de N₂ (337 nm) para realizar la desorción/ionización de los analitos. La detección de los iones se realizó con un analizador de tiempo de vuelo en modo lineal.

Capítulo *3*

Materiales y Métodos



3.1 – Introducción

En este capítulo se describen los procedimientos experimentales más generales y frecuentes realizados en este trabajo de tesis. Entre ellos se incluye: la purificación y caracterización de lipopolisacárido, la caracterización de los derivados de peroxidasa de rábano picante, la construcción de las plataformas de medición, entre otros. Por su parte, en los capítulos consecuentes se detallarán otros procedimientos experimentales más específicos.

3.2 – Purificación y caracterización de lipopolisacárido

3.2.1 – Introducción

Desde hace décadas varios métodos han sido desarrollados para extraer lipopolisacáridos de *Salmonella* y otras bacterias gram-negativas [190]. Uno de estos métodos, el cual es ampliamente utilizado, es el procedimiento de fenol-agua [191], dada su aplicabilidad a muchos y diversos grupos de bacterias y porque es uno de los pocos métodos que permite la extracción de lipopolisacáridos de bacterias mutantes R. En este método, la bacteria seca se trata a 69 °C en una mezcla de fenol y agua. Al enfriar, la mezcla, que es monomérica por encima de 68 °C, se separa entre una fase fenólica, que contiene principalmente proteínas, y una fase acuosa que contiene el lipopolisacárido y los ácidos nucleicos. Este procedimiento coextrae además de ácidos nucleicos, polisacáridos, algunas proteínas y ocasionalmente otros componentes de la pared celular bacteriana. Si bien la mayor proporción de LPS suele quedar retenido en la fase acuosa, se han reportado casos de lipopolisacáridos solubles en la fase fenólica [192, 193]. Hoy en día, el procedimiento de extracción de LPS más utilizado es una variante desarrollada por Brade y Galanos [194] del procedimiento de fenol-agua. Si bien, este último procedimiento permite obtener preparaciones altamente puras, prácticamente libres de ácidos nucleicos, proteínas, glicanos u otros componentes de la pared celular bacteriana, los extractos comercialmente disponibles suelen contener estos contaminantes.

Por otra parte, los lipopolisacáridos forman un grupo heterogéneo de moléculas. La variabilidad se debe principalmente a modificaciones no estequiométricas de la región del lípido A y del núcleo sacárido (*core*), y también a variaciones en el número de unidades repetitivas en el antígeno O. Algunos métodos han sido utilizados para separar

subclases de LPS obtenidos de cepas individuales, entre ellos se pueden mencionar: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) [195, 196], electroforesis capilar [197], electroforesis DOC-PAGE [198], cromatografía de exclusión por tamaño [199, 200], cromatografía líquida con resinas de intercambio aniónico [201] y cromatografía de interacción hidrofóbica [202]. Estos métodos son difíciles, principalmente debido a la tendencia del LPS a formar agregados y a la dificultad de detectarlo e identificar las distintas subclases.

En este trabajo de tesis la purificación del LPS provisto por Sigma, proveniente de una extracción con fenol-agua, se llevó a cabo por cromatografía líquida de exclusión por tamaño. El procedimiento aplicado corresponde a un desarrollo realizado en nuestro grupo de trabajo [122], al cual se le incluyeron nuevas etapas de purificación.

3.2.2 – Experimental

3.2.2.1 – Reactivos

LPS liso de *Salmonella Minnesota* fue provisto por Sigma (N° de catálogo: L6261) (***Nota: LPS puede causar fiebre. Puede ser nocivo por inhalación, ingestión o en contacto con la piel. Deben ser empleadas buenas técnicas de laboratorio: se debe utilizar guardapolvo, guantes y anteojos de seguridad para su manipulación, trabajar en áreas ventiladas y evitar todo contacto con heridas expuestas***). El test LAL cromogénico fue provisto por CAMBREX BioScience Walkersville, Inc. El agua apirógena fue producida por bidestilación de agua destilada, previamente pasada a través de un sistema de agua MilliQ y colectada en material de vidrio apirógeno (5 hs a 220 °C); valores por debajo de 0,01 UE ng⁻¹ se obtuvieron rutinariamente (determinado empleando el test LAL). Albúmina de suero bovino (BSA), ácido 3-desoxi-D-*mano*-2-octoulosónico (Kdo), glicina, β-mercaptoetanol y dodecil sulfato de sodio (SDS) fueron provistos por Sigma. Acrilamida y bisacrilamida se obtuvieron de J. T. Baker. El concentrado de reactivo colorimétrico para el ensayo de proteínas fue provisto por Bio-Rad Laboratories, Inc. Las membranas de diálisis de celulosa regenerada (RC Spectra/Por) de corte molecular 3500 se obtuvieron de Spectrum® Laboratories.

3.2.2.2 – Cromatografía de exclusión por tamaño

LPS liso de *Salmonella Minnesota* fue purificado cromatográficamente a 25 °C con una columna Sephacryl HiPrep 16/60 (S-200 HR GE Healthcare de 120 mL de capacidad), cuyo intervalo de separación en masas molares es: 5000 a 250000 para proteínas globulares y 1000 a 80000 para dextranos. A tal efecto se empleó un sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) modelo ÄKTA Explorer 10 (GE Amersham). El buffer de elución empleado fue Tris 10 mM pH 8,0, conteniendo NaCl 0,2 M, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, azida sódica 0,02 % p/v y deoxicolato de sodio (NaDC) 0,25 % p/v.

La columna fue equilibrada con al menos 2 volúmenes de columna (VC) de buffer de elución. La muestra a separar se preparó disolviendo entre 50 y 60 mg de LPS en 3 mL de buffer. Posteriormente, fue inyectada y eluida isocráticamente a un flujo de 0,5 mL min⁻¹, durante 1,5 VC, colectando fracciones de 3 mL. El seguimiento de la corrida cromatográfica se realizó registrando la absorbancia a 280 y 260 nm. Luego, con el propósito de remover el exceso de detergente, las fracciones que contenían el LPS fueron pasadas por dos columnas de desalado HiTrap en serie (GE Healthcare de 5 mL de capacidad cada una) empleando como buffer de elución fosfato 15 mM pH 7,5 conteniendo NaCl 15 mM a un flujo de 2 mL min⁻¹. En este caso, el seguimiento de la elución se realizó monitoreando la absorbancia a 205 nm, longitud de onda a la cual el LPS presenta una absorción significativa, debido principalmente a la presencia de grupos carbonilo en su estructura. Finalmente, las fracciones fueron agrupadas de a dos consecutivas y dializadas con el objetivo de remover el detergente y las sales remanentes. La diálisis se llevó a cabo con tubos de diálisis de corte molecular 3500 contra buffer contra agua MilliQ por otras 48 hs a 4 °C. Luego, las fracciones fueron liofilizadas, a las cuales se les determinó: el contenido de proteínas, el contenido de ácidos nucleicos, la actividad endotóxica, el contenido de Kdo y la presencia de Ca²⁺ según se detalla más adelante. También, estas fracciones fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS según las especificaciones del apartado 3.2.2.3. El LPS purificado y liofilizado se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Luego de la purificación, la columna debe lavarse con 0.5 VC de NaOH 0,2 M seguidos por al menos 2 VC de agua MilliQ y conservarse en solución de etanol:agua 20 % v/v. Lavados más rigurosos pueden realizarse con 0.25 VC de NaOH 0,5 M seguidos por 4 VC de agua MilliQ ó 0.5 VC de isopropanol:agua 30% v/v (para remover lípidos y

proteínas muy hidrofóbicas) seguidos por 4 VC de agua MilliQ. Todas las soluciones deben pasarse previamente por filtros de 0,2 μm de tamaño de poro y ser desgasadas.

Cuantificación de proteínas. Se empleó el método descrito por Bradford [203], utilizando un concentrado de reactivo colorimétrico para el ensayo de proteínas provisto por Bio-Rad Laboratories, Inc. En este ensayo se emplea albúmina de suero bovino (BSA) como estándar de calibración a menos que se indique lo contrario.

Cuantificación de ácidos nucleicos. El contenido de ARN fue determinado por espectroscopía UV midiendo el valor de absorbancia a 260 nm. Las bases nitrogenadas en los nucleótidos presentan una absorción máxima alrededor de 260 nm según lo indicado en la Tabla 3.1 [204]. En base a los coeficientes de absorción molar, la absorbancia a 260 nm de una solución 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (118 μM , considerando una masa molecular promedio de 340 Da/base) de ARN de simple hebra, en una cubeta de 1 cm de camino óptico es igual a 1. De esta forma, utilizando una técnica sencilla no destructiva puede determinarse su concentración.

Debido a que algunos contaminantes, por ejemplo solventes provenientes del proceso de extracción, pueden absorber a esa longitud de onda, se recomienda también evaluar la absorbancia a 240 nm de modo de detectar esas interferencias. Las proteínas presentan un máximo de absorción a 280 nm, por lo que también podrían afectar la determinación. En particular, la muestra comercial de LPS que se utiliza en este trabajo de tesis posee un bajo nivel de contaminación proteica en comparación con su contenido de ARN (Tabla 3.2 pág. 70), lo que hace que la contribución de las proteínas a la medida de absorción a 260 nm sea pequeña en la mayor parte de las muestras analizadas.

	A	T	G	C	U	ARN	ADN
$\epsilon / \text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	13,4	7,9	8,1	6,1	8,2	8,5	7,6
$\lambda_{\text{máx}} / \text{nm}$	260,5	264,5	275	267	259,5	260	260

Tabla 3.1: Absorción UV de nucleótidos y ácidos nucleicos

Actividad endotóxica. La determinación de la potencia endotóxica de las muestras de LPS se determinó mediante el uso del ensayo de endotoxinas bacterianas LAL cromogénico cuantitativo, QCL-1000 provisto por CAMBREX BioScience Walkersville, Inc.

Contenido de Ca^{2+}/Mg^{2+} . Se empleó el ensayo de dureza Duralarm, Fresenius Medical Care Argentina. Se realizó sobre soluciones de LPS de concentración no menor a 1 mg mL⁻¹. El ensayo presenta un límite de detección de 2 ppm.

Contenido de Kdo. Se empleó el procedimiento descrito por Lee y Tsai [205].

3.2.2.3 – Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se llevó a cabo empleando geles de poliacrilamida de 15 cm de longitud, 14 cm de ancho y 0,15 cm de espesor. La corrida electroforética se llevó a cabo utilizando un equipo Hoefer modelo SE 400. El sistema de electroforesis Laemmli [206] involucró el uso de buffer Tris 25 mM pH 8,8, glicina 0,19 M y SDS 0,1 % p/v como buffer de corrida. El gel de resolución estuvo formado por acrilamida 12,5 % p/v, buffer Tris 0,375 M pH 8,8 y SDS 0,1 % p/v, mientras que el gel de preconcentración contenía acrilamida 5 % p/v, buffer Tris 6 mM pH 6,8 y SDS 0,1 % p/v. Las muestras detectadas por tinción de plata fueron disueltas en agua MilliQ y mezcladas en una proporción 2 a 1 con el buffer de siembra, conteniendo: buffer Tris 0,15 M pH 6,8, azul de bromofenol 0,075 % p/v, β-mercaptoetanol 15 % v/v, glicerol 30 % v/v y SDS 6 % p/v. Luego, fueron tratadas en baño de agua a ebullición durante 5 minutos. Las muestras reveladas por detección de actividad de peroxidasa fueron disueltas en agua MilliQ y mezcladas en una proporción 2 a 1 con buffer de siembra sin β-mercaptoetanol y no fueron calentadas. El volumen de siembra empleado fue de 25 a 50 µL conteniendo entre 2,5 y 20 µg de muestra según el caso. La electroforesis se corrió a 30 mA a 4 °C durante 6 horas, hasta que el colorante indicador alcanzó el fondo del gel.

Para la tinción con plata se siguió la técnica descrita por Tsai y Frasch [207] con algunas modificaciones como se detalla a continuación: Una vez corrido el gel, el LPS se fija al mismo, sumergiéndolo en la *solución fijadora 1* (40 % v/v etanol y 5% v/v ácido acético en agua MilliQ), toda la noche a 4 °C con agitación orbital moderada. Se notará que el gel encoge. Luego, la solución fijadora 1 se reemplaza por la *solución fijadora 2*, que produce la oxidación de los azúcares (40% v/v etanol, 5% v/v ácido acético y 0.7% p/v periodato de sodio). Pasados 5 minutos, el gel se lava exhaustivamente con agitación moderada para retirar el exceso de periodato, con: a) 1 lavado de 500 mL con 40 % v/v etanol y 5% v/v ácido acético, b) 1 lavado de 500 mL con 40% v/v etanol en agua, y c) 3 lavados de 15 minutos cada uno con 500 mL de agua

MilliQ por lavado. Con estos lavados se observará que el gel retoma su tamaño. Una vez que el gel ha sido lavado, se retira el agua y se vierte sobre él, la tintura de plata recién preparada, agitando durante 10 minutos, a oscuras.

Para la preparación de la *tintura de plata* se procede de la siguiente manera: 2,4 mL de NH_4OH 25 % v/v se agregan a 28 mL de NaOH 0,1 M. Luego, 5 mL de 20 % p/v de AgNO_3 se agregan a la solución anterior con agitación suave. Debe observarse transitoriamente la formación de un precipitado marrón que desaparece con la agitación, debido a la formación del complejo $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$. Finalmente, se lleva a un volumen final de 150 mL con agua MilliQ.

Luego de la tinción con plata, se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno con 500 mL de agua MilliQ por lavado, a oscuras. Se retira el agua y se coloca el *revelador* (ácido cítrico 50 mg L^{-1} y formaldehído 37 % v/v $0,5 \text{ mL L}^{-1}$) que da lugar a la formación del espejo de plata sobre cada siembra que contenga azúcares reductores. El revelado del gel debe concluirse cuando las bandas adquieren la intensidad de color deseada o cuando el fondo translúcido del gel muestra los primeros signos de coloración. Las bandas en el gel adquieren un color marrón oscuro en unos 5 minutos. Alcanzada esa instancia, se toma una fotografía o se determinan las distancias de migración para cada banda.

El revelado por actividad de peroxidasa involucró los siguientes pasos: el gel fue enjuagado con 500 mL de solución de triton X-100 1,5 % v/v durante 1 hora a temperatura ambiente, luego 2 veces con 500 mL de agua MilliQ durante 15 minutos cada vez. Finalmente fue sumergido en una solución de pirogalol $0,6 \text{ g L}^{-1}$ y peróxido de hidrógeno $0,8 \text{ g L}^{-1}$ en buffer fosfato 100 mM pH 6,0.

3.2.3 – Resultados

A continuación, a modo de ejemplo se muestra un perfil de elución de la columna cromatográfica (Figura 3.1), donde se registra la absorbancia a 280 y 260 nm. El perfil cromatográfico está caracterizado por cuatro regiones bien definidas, según su absorbancia. Estas regiones son:

- 1.- De 35 a 44 mL $A_{\text{máx } 260 \text{ nm}} \cong 400 \text{ mUA}$
- 2.- De 44 a 60 mL $A_{\text{máx } 260 \text{ nm}} \cong 0 \text{ mUA}$
- 3.- De 60 a 90 mL $A_{\text{máx } 260 \text{ nm}} \cong 1300 \text{ mUA}$
- 4.- De 90 a 130 mL $A_{\text{máx } 260 \text{ nm}} \cong 5000 \text{ mUA}$

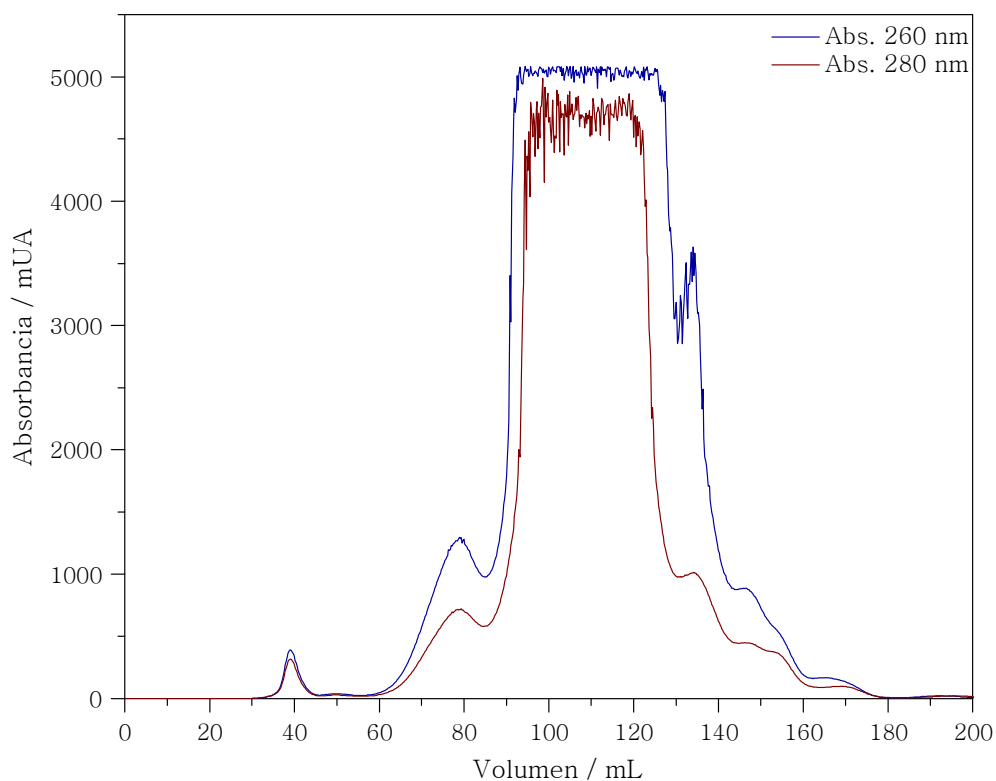


Figura 3.1: Cromatografía de exclusión por tamaño según las especificaciones de la sección 3.2.2.2. 3 mL de LPS de *S. Minnesota* 20 mg mL⁻¹ inyectado en buffer de corrida.

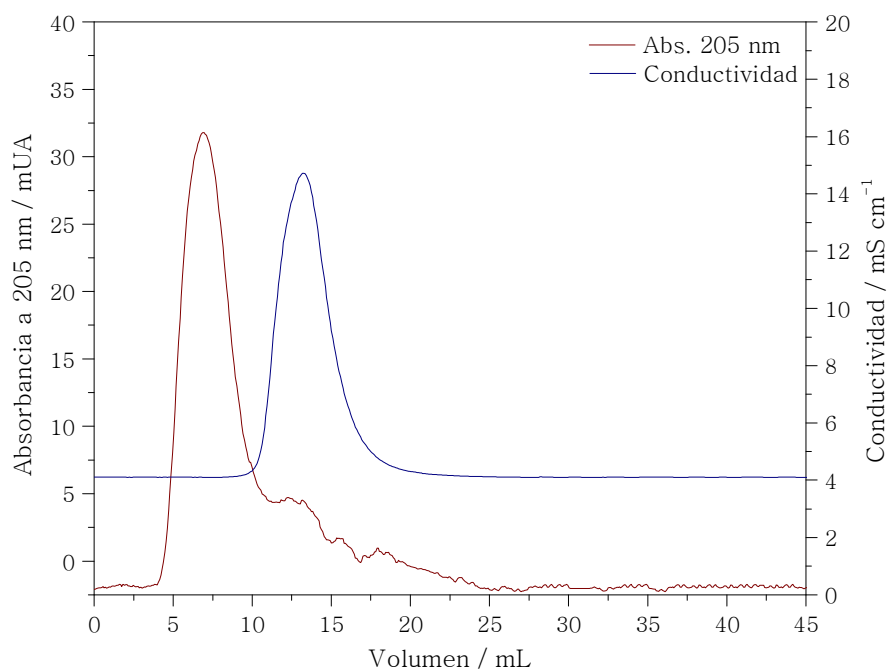


Figura 3.2: Desalado de las fracciones de LPS eluidas de la columna de exclusión por tamaño. Cada purificación corresponde a la inyección de una fracción de 3 mL de LPS, aquí ejemplificado con la fracción 44-47.

Estas regiones indican el contenido de ARN y proteínas de las distintas fracciones, sin embargo, no puede conocerse a partir de este perfil la zona de elución de LPS. Un análisis posterior del eluido permite identificar las fracciones que contienen LPS (Tabla 3.2).

Finalizada la corrida cromatográfica, las fracciones colectadas se pasaron por dos columnas de desalado HiTrap en serie con el objetivo de remover el exceso de deoxicolato de sodio. El seguimiento cromatográfico se realizó midiendo la absorbancia a 205 nm. El primer pico corresponde (Figura 3.2) a la elución del LPS. Posterior a este pico, la fuerza iónica aumenta denotando la elución de las sales del buffer empleado en la purificación cromatográfica precedente. Se colectaron las fracciones de LPS agrupándolas de a dos en forma consecutiva. Posteriormente se dializaron y liofilizaron.

Muestra	Volumen de elución (mL)	ARN (% p/p)	Proteínas (% p/p)	Kdo (% p/p)	Actividad endotóxica (UE ng ⁻¹) ¹	Ca ²⁺
LPS de S. Minnesota (Sigma)		46	0,8	1,0	1,3	+
7-8	35-41	1,5	1	0,2	0,6 - 0,9	nd
9-10	41-47	0,3	0,3	0,4	1,1 - 1,7	-
11-12	47-53	0,2	0,3	1,1	0,6 - 1,1	-
13-14	53-59	0,1	0,2	0,7	0,8 - 1,0	-
15-16	59-65	1,6	0,8	1,2	0,9 - 1,5	-
17-18	65-71	3,4	1,2	1,6	0,5 - 1,0	nd
19-20	71-77	6,0	2,0	0,1	0,05 - 0,1	nd
21-22	77-83	14,0	2,0	0,01 <	0,01 <	nd

¹ Actividad endotóxica determinada sobre fracciones de LPS provenientes de al menos dos purificaciones distintas.
nd: no determinado.

Tabla 3.2: Resultados de la caracterización del LPS de *S. Minnesota* provisto por Sigma y de sus fracciones purificadas. El volumen de elución corresponde a la Figura 3.1.

Sobre las muestras liofilizadas se determinó el contenido de proteínas, el contenido de ácidos nucleicos, la actividad endotóxica, el contenido de Kdo y la presencia de Ca^{2+} . La Tabla 3.2 y la Figura 3.3 resumen los resultados obtenidos.

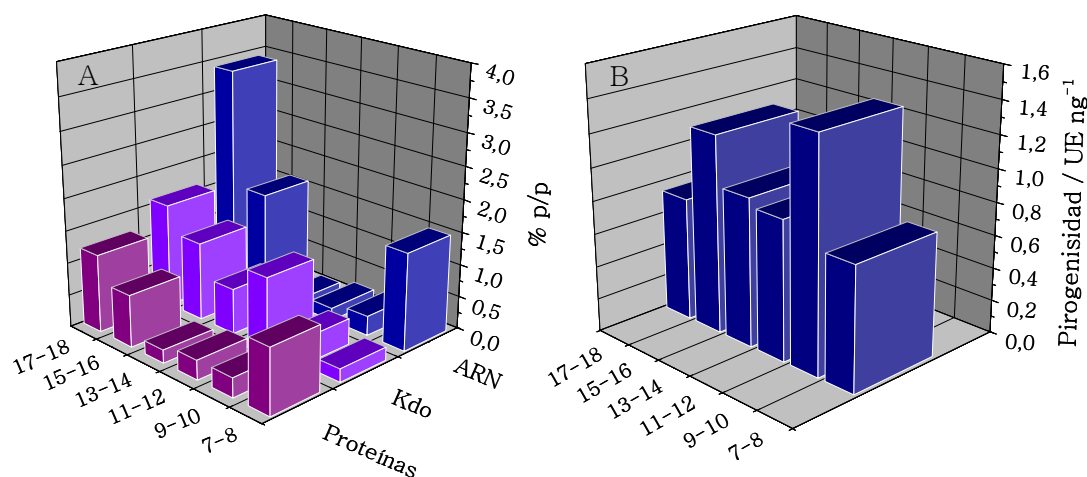


Figura 3.3: Resultados de la caracterización de las fracciones purificadas de LPS de *S. Minnesota*. A) Análisis de ARN, Kdo y Proteínas. B) Actividad endotóxica.

De acuerdo a estos resultados el LPS eluye entre los 35 y los 77 mL correspondiente a las regiones 1 y 2 y el inicio de la región 3. A partir de los 77 mL el eluido se va enriqueciendo en el porcentaje de ARN y proteínas disminuyendo drásticamente el porcentaje de Kdo y su actividad endotóxica. En las fracciones correspondientes a la región 1 y 2 (35 a 60 mL) se concentra la mayor actividad endotóxica, siendo la región 2 (44 a 60 mL) la de mayor pureza. Esta información es valiosa en lo que respecta a la elección de una fracción de LPS para llevar a cabo un ensayo competitivo o en la síntesis de conjugados.

Las fracciones de LPS fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. En la Figura 3.4 puede observarse el patrón de migración en forma de escalera característico del LPS. Esto confirma, en conjunto con la información presentada hasta ahora, que el LPS comercial del cual dispusimos es una muestra de masa molar muy heterogénea. En la purificación cromatográfica, dadas las características de la columna empleada, los analitos de mayor masa molar, que son aquellos con menor interacción con la columna, eluyen primero. En la electroforesis, los analitos migran de acuerdo a su masa molar, siendo los más pequeños quienes presentarán mayor movilidad. En particular, cada una de las bandas que puede distinguirse dentro de una misma calle de siembra puede asignarse a la disminución de

una subunidad repetitiva de la región del antígeno O. De esta forma, la fracción 7-8 corresponde a la fracción de LPS de mayor masa molar, siendo la 17-18 la de menor. Las fracciones por encima de esta última presentaron niveles de endotoxidad y porcentaje de Kdo (Tabla 3.2) muy bajos, y además no pudieron detectarse por electroforesis. Siendo así, la región de elución de LPS queda acotada entre los 35 y los 77 mL según el perfil cromatográfico de la Figura 3.1.

La información que se obtiene de los geles de electroforesis realizados en estas condiciones es muy útil en cuanto a la comparación de las distintas fracciones de LPS según su perfil de migración y también respecto de su comparación con los derivados que pueden sintetizarse a partir de estas fracciones. Un ejemplo de lo último mencionado se presentará más adelante en el capítulo 6.

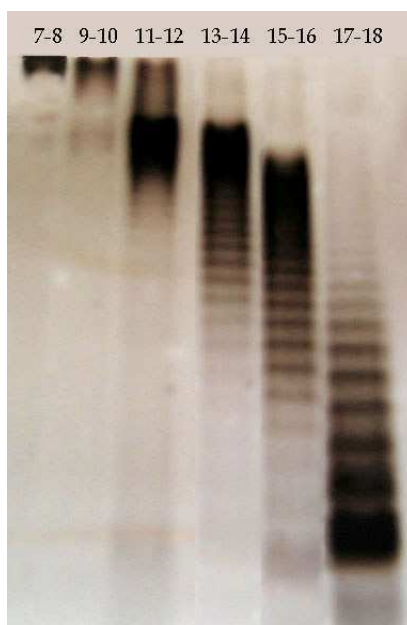


Figura 3.4: Electroforesis en gel de poliacrilamida 17,5 % con SDS de fracciones purificadas de LPS de *S. Minnesota* reveladas por tinción con plata. En el margen superior del gel se indica la fracción sembrada. En todos los casos se sembraron 50 μ L conteniendo 10 μ g de LPS.

3.2.4 – Sumario

Como puede observarse en la Tabla 3.2, el LPS provisto por Sigma, obtenido a partir de la extracción con fenol-agua posee un elevado contenido de ARN (46 % p/p). El procedimiento de purificación por cromatografía de exclusión brinda resultados

satisfactorios permitiendo disminuir en gran medida las impurezas presentes en el material de partida. El nivel de ARN pudo disminuirse a valores entre 0,1 y 3,4 % p/p dependiendo de la fracción. Las fracciones con actividad endotóxica se encuentran principalmente dentro de las regiones 1 y 2 siendo las fracciones 9–10 (41–47 mL), 11–12 (47–53) y 13–14 (53–59) las de mejor calidad dada su buena actividad endotóxica y bajos niveles de ARN y proteínas.

Del perfil cromatográfico (Figura 3.1) y del perfil de migración en el gel de electroforesis (Figura 3.4) puede evidenciarse la polidispersión que presenta la muestra de LPS. La separación cromatográfica permitió purificar el LPS y además obtener grupos de masa molar acotada de LPS.

3.3 – Síntesis de carboximetildextrán70 (CMDex70)

El método de carboximetilación de dextrano ha sido previamente descripto [208, 209]. Brevemente, 10 g de dextrano (Sigma, Mr 68800 g mol⁻¹) fueron disueltos en 50 mL de solución de ácido bromoacético (Sigma) 15 % p/v, conteniendo 3,5 g de hidróxido de sodio (Figura 3.5). Luego, la mezcla de reacción fue incubada por 48 horas a 40 °C con agitación. Finalizada la reacción, se enfrió la solución a temperatura ambiente y la mezcla fue llevada a pH 6,5 con ácido acético. El producto obtenido se dializó a 25 °C contra agua milliQ durante 72 horas usando membranas de corte molecular 3500, con 5 cambios de líquido de 2 litros cada vez. Posteriormente, la solución se dividió en 10 tubos conteniendo unos 6 mL cada uno y se liofilizó. El sólido obtenido se conservó a -20 °C hasta su uso.

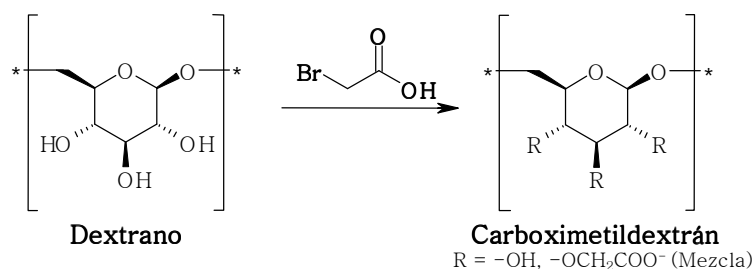


Figura 3.5: Esquema de reacción de la carboximetilación del dextrano.

El carboximetildextrán70 (CMDex70) obtenido fue caracterizado por espectroscopía RMN ¹³C empleando un espectrómetro Bruker Avance 500 MHz. La Figura 3.6 corresponde al espectro de ¹³C RMN de carboximetildextrán70 realizado en agua deuterada. Entre 178,90 y 177,78 ppm se observan las señales correspondientes

al carbono del grupo $-\text{COOH}$, indicando la carboximetilación del polímero. Por integración de las señales pudo calcularse una relación de $\text{COOH}:\text{monómero}$ (unidad de glucosa) de 1:10.

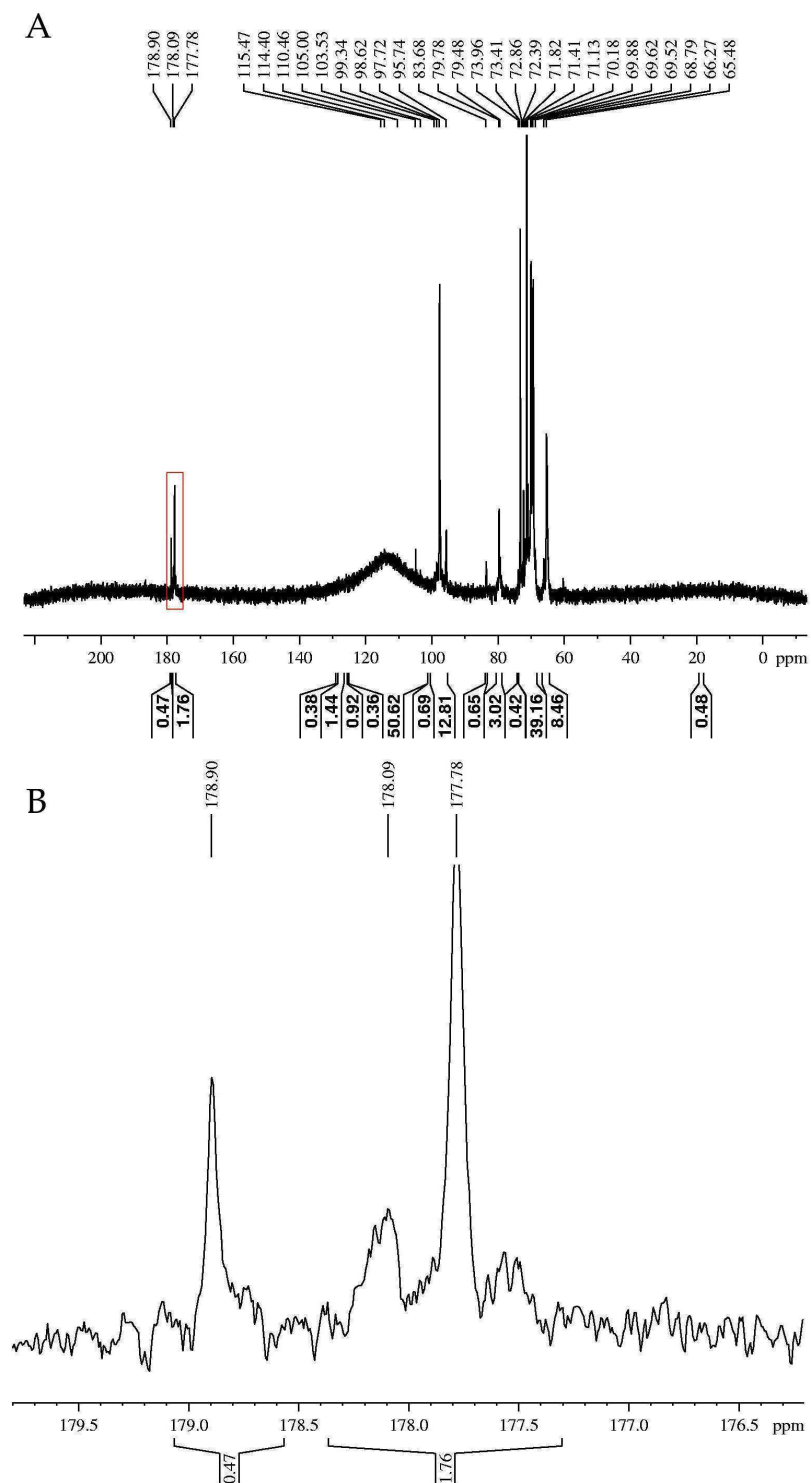


Figura 3.6: Espectro de ^{13}C RMN de carboximetildextrán70 en D_2O . A) Espectro completo. B) Ampliación de la zona recuadrada en rojo.

3.4 – Determinación electroquímica del coeficiente de difusión del mediador [Os(bpy)₂pyCl]PF₆

El complejo de Os, [Os(bpy)₂(py)Cl]PF₆, utilizado como mediador soluble en los experimentos presentados en el capítulo 4 y 8, fue caracterizado en relación a su coeficiente de difusión. Como fue introducido en el capítulo 2, el análisis de la voltametría cíclica permite la obtención de este parámetro [168], según la ecuación 2.4.

Determinando la corriente de pico (i_p) a distintas velocidades de barrido (v) y graficando i_p versus $v^{1/2}$, puede calcularse el valor del coeficiente de difusión de la especie electroactiva (D_0) a partir de la pendiente del gráfico.

3.4.1 – Experimental

Como electrodos de trabajo, se utilizaron láminas planas de oro de 1 cm² de área, tratadas previamente según el protocolo descrito en 3.6.1. Los electrodos modificados Au/Cys/CMDex24+ PEG5000 y Au/Cys/CMDex70 se construyeron a partir de estas láminas de oro, en base a lo detallado en el capítulo 4. Los electrodos fueron sumergidos en la celda electroquímica conteniendo al complejo [Os(bpy)₂(py)Cl]PF₆ en una concentración de 40 μM (Mr 762 g mol⁻¹) en buffer Tris 50 mM pH 7,5 con KNO₃ 0,2 M como electrolito soporte. Como contraelectrodo se empleó una malla de platino y un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia. El potencial se varió entre 0 y 600 mV versus Ag/AgCl a distintas velocidades de barrido, entre 2 y 100 mV s⁻¹.

3.4.2 – Resultados

La Figura 3.7 muestra las voltametrías cíclicas obtenidas para electrodos de oro sin modificar (Au) y para electrodos modificados Au/Cys/CMDex70 y Au/Cys/CMDex24+ PEG5000. En la figura puede observarse, que para los electrodos ensayados, la cupla Os(II)/Os(III) presenta un comportamiento reversible, en base a los criterios detallados en 2.2.3.1. La cupla presenta un comportamiento reversible como lo demuestra la separación de los picos anódico y catódico para cada voltamograma (entre 58–61 mV) y la relación entre estos picos es prácticamente igual a uno.

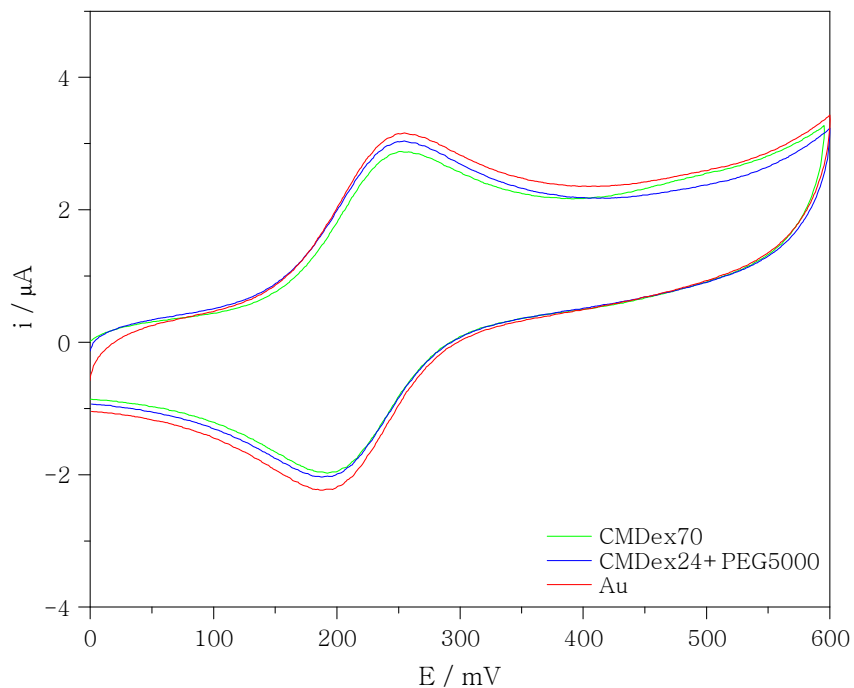


Figura 3.7: Voltametría cíclica para un electrodo de oro y electrodos modificados. $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCl}]^+$ 40 μM en buffer Tris 50 mM pH 7,5 + KNO_3 0,2 M. Velocidad de barrido: 10 mV s^{-1} .

En la Tabla 3.3 se presentan los valores de corriente de pico obtenidos para cada uno de los electrodos estudiados a distintas velocidades de barrido. A partir de estos datos se construyeron los gráficos i_p versus $v^{1/2}$, de cuyos valores de las pendientes pudieron extraerse las magnitudes de los coeficientes de difusión.

v (V s^{-1})	$v^{1/2}$ ($\text{V}^{1/2} \text{s}^{-1/2}$)	i_p (μA)		
		Au	Au/Cys/CMDex24+ PEG5000	Au/Cys/CMDex70
0,002	0,044	0,691	0,669	0,745
0,005	0,071	1,186	1,232	1,044
0,010	0,100	1,903	1,830	1,652
0,025	0,158	3,326	3,299	2,760
0,050	0,224	4,759	4,694	3,911
0,100	0,316	6,669	6,234	5,402

Tabla 3.3: Corrientes de pico obtenidas para distintos electrodos a diferentes velocidades de barrido. $[\text{Os}(\text{II})] = 40 \mu\text{M}$ en buffer tris 50 mM pH 7,5 con KNO_3 0,2 M.

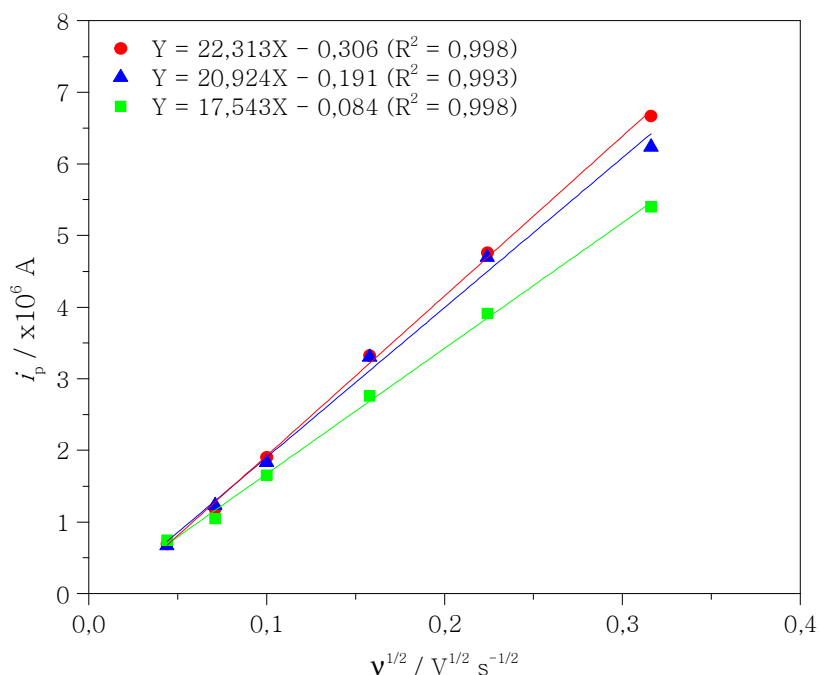


Figura 3.8: Corrientes de pico en función de la velocidad de barrido. Au (círculos rojos); Au/Cys/CMDex24+ PEG5000 (triángulos azules); Au/Cys/CMDex70 (cuadrados verdes).

El coeficiente de difusión del complejo de osmio para las distintas superficies estudiadas resultó ser: $4,3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para el electrodo de oro sin modificar; $3,8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para el electrodo Au/Cys/CMDex24+ PEG5000; y $2,7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para el electrodo Au/Cys/CMDex70.

Puede observarse que las diferencias en los valores de D_0 son pequeñas, lo que indica que el mediador puede acceder libremente a la superficie de oro permitiéndose el proceso reversible de transferencia de electrones. Se han obtenidos resultados similares, nunca inferiores al correspondiente para Au/Cys/CMDex70, para electrodos modificados con derivados de dextrano donde se ha adsorbido el conjugado de neutravidina con peroxidasa de rábano picante (N-HRP). El detalle experimental de la construcción de estas plataformas se presenta en el capítulo 4.

3.5 – Caracterización de conjugados de LPS

En este trabajo de tesis se han sintetizado una serie de conjugados de LPS. Sus procedimientos de síntesis están detallados en los capítulos 5, 6 y 7. Todos los derivados de LPS fueron caracterizados por su contenido de Kdo y actividad pirógena según lo descrito en el apartado 3.2.2.2. La relación de conjugación para cada uno de

los conjugados obtenidos fue evaluada por determinación del contenido de LPS y de la sonda unida al lipopolisacárido. La cantidad de LPS fue establecida por análisis de Kdo para el conjugado y para una solución de concentración conocida de la misma fracción de LPS empleada en la síntesis. La cantidad de la sonda fue determinada por distintas técnicas según las características de la sonda en particular.

3.5.1 – Determinación de la concentración de dansilo por espectroscopía de fluorescencia

Luego de la purificación, el conjugado de LPS con dansilo se disolvió en agua MilliQ y fue sometido a espectroscopía de fluorescencia en cubetas de poliestireno de 1 cm de camino óptico empleando un espectrofluorómetro PTI Quantamaster. La longitud de onda de excitación fue fijada a 325 nm; la emisión fue determinada entre 350 y 750 nm y se determinó el área de emisión. La apertura de rendija fue de 1 mm tanto para la luz de excitación como para la de emisión empleando un tiempo de integración de 10 s.

Con el objetivo de determinar la derivatización obtenida en el LPS, se construyó una curva de calibración usando estándares de hidracina de dansilo (Fluka) entre 0,6 y 12,0 μM en agua MilliQ. De forma similar se realizaron espectros del conjugado a concentraciones entre 5 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La relación LPS:dansilo fue calculada de muestras del conjugado LPS-dansilo de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, por debajo de la concentración micelar crítica (CMC) del lipopolisacárido [31].

3.5.2 – Análisis de HRP y sus derivados por espectrometría MALDI-TOF

La espectrometría MALDI-TOF se empleó en la caracterización de HRP y sus derivados utilizados en la síntesis de conjugados de LPS-HRP según se describe en los capítulos 6 y 7. El análisis se llevó a cabo en modo positivo empleando un espectrómetro de masa Bruker modelo OmniFLEX Daltonics operado en modo lineal a un voltaje de aceleración de 19 KeV. La solución fotomatricial se preparó por disolución de ácido sinapínico a una concentración de 1 % p/v, en una solución de acetonitrilo-TFA 0,1 % v/v (70:30 v/v). Las soluciones de HRP, PEG-HRP, FMOC-PEG-HRP, dHRP, dHRP-PEG-NH₂ y BSA 0,1 mM fueron preparadas en agua MilliQ. Las soluciones de las muestras se prepararon mezclando las soluciones proteicas con la solución de la fotomatriz en una relación 1:10. La siembra se realizó sobre un portamuestra de acero inoxidable colocando en cada caso 1 μL de la solución y dejando evaporar el solvente. El equipo opera con un láser de N₂ (337 nm) para realizar la desorción/ionización de los

analitos. En todos los casos, la calibración se llevó a cabo empleando BSA como estándar externo empleando las señales correspondientes a $(M + H)^+ = 66431$ y $(M + 2H)^{2+} = 33216$ (Figura 3.10), según lo reportado en [210]. En todos los casos, el portamuestras metálico se sembró colocando la muestra de calibración adyacente a cada uno de los analitos como muestra la Figura 3.9. De esta forma, la medición para cada analito se calibra respecto de una muestra de BSA adyacente permitiendo luego la comparación de los espectros de los distintos derivados de HRP preparados.



Figura 3.9: Siembra de muestras en una sonda metálica de 49 posiciones.

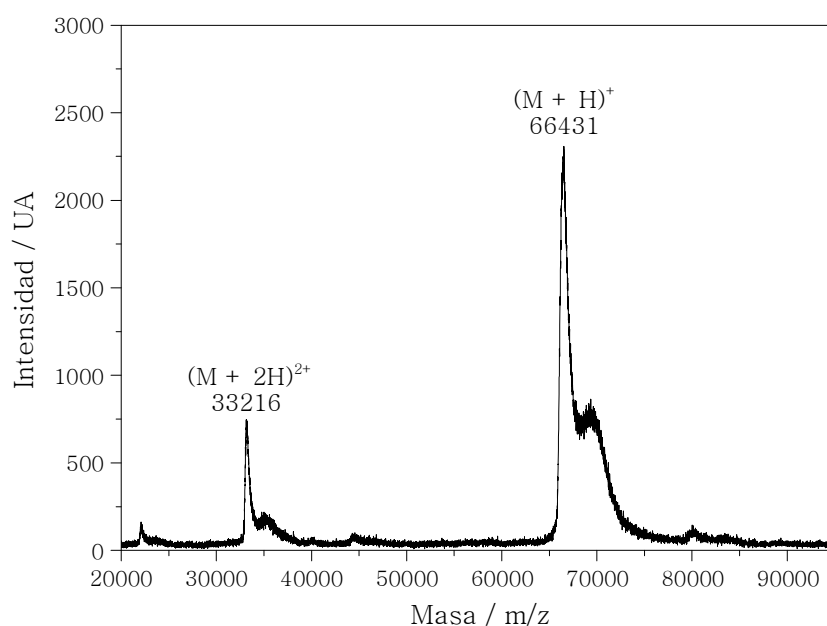


Figura 3.10: Espectrometría de masa MALDI en modo positivo de BSA.

3.5.3 – Actividad enzimática de HRP

La actividad de la peroxidasa fue determinada espectrofotométricamente siguiendo el procedimiento descrito por Chance y Maehly [211]. El ensayo utiliza pirogalol como agente reductor. Sobre 1,45 mL de solución de buffer fosfato 15 mM pH 6 conteniendo pirogalol 0,55 % p/v y peróxido de hidrógeno 0,027 % p/v se agregan 50 μ L de solución de enzima ($\approx 0.4 - 0.7 \text{ U mL}^{-1}$), se mezcla por inversión y se mide la absorbancia a 402 nm. El incremento en la absorbancia debido a la oxidación del pirogalol por la enzima se monitorea a 20 °C durante 300 segundos. Las mediciones se realizaron empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.

Una unidad de peroxidasa se definió como la cantidad de enzima que produce 1 mg de purpurogalina a partir de pirogalol en 20 segundos a pH 6.0 y 20 °C. La actividad de la enzima se expresa como unidades de peroxidasa por mg de HRP. La concentración de peroxidasa se determinó espectrofotométricamente según la sección 3.5.4.1.

3.5.4 – Determinación de la concentración de HRP

3.5.4.1 – Espectroscopía de absorción molecular

La concentración de HRP fue determinada espectrofotométricamente a partir de su absorbancia a 403 nm (correspondiente a la banda Soret del grupo hemo), asumiendo $102000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ como su coeficiente de absorción molar [127]. Las mediciones se realizaron empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A usando una celda de 10 mm de camino óptico. En todos los casos los espectros se realizaron sobre soluciones acuosas de la enzima. Este procedimiento se aplicó a soluciones de enzima a las cuales se le evaluó la actividad enzimática y a soluciones de conjugados LPS-HRP de modo de cuantificar su relación de conjugación.

3.5.4.2 – Ensayo colorimétrico

Se empleó el método descrito en la sección 3.2.2.2 utilizando HRP (Biozyme) como estándar de calibración.

3.6 – Construcción de la plataforma multielectrodos

La construcción del arreglo multielectrodos se llevó a cabo de acuerdo a resultados previamente publicados [189]. Sobre placas de mylar de 350 μm de espesor, se imprimió con pintura de plata (Ercon Inc. Cat. N° E1660-136) para mejorar la conductividad de las pistas y luego se hizo un cubrimiento con pintura de grafito (Ercon Inc. Cat. N(E3456). Posteriormente los electrodos fueron pulidos con alúmina de 0,3 y 0,05 μm y recubiertos con pintura aislante dejando expuesta solo la región destinada al depósito de oro.

El depósito de oro se realizó galvanostáticamente haciendo circular por la celda 2,5 mA cm^{-2} durante 15 minutos con agitación orbital a 80 rpm. La solución de deposición contenía $\text{KAu}(\text{CN})_2$ 15 mg mL^{-1} y ácido cítrico 115 mg mL^{-1} , ajustado a pH 4 con KOH. Finalizada esta operación, las placas fueron tratadas térmicamente a 140 $^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas. La Figura 3.11 esquematiza la construcción de la plataforma. De esta forma, pudieron construirse arreglos de 8 electrodos de 0,6 cm^2 de área.

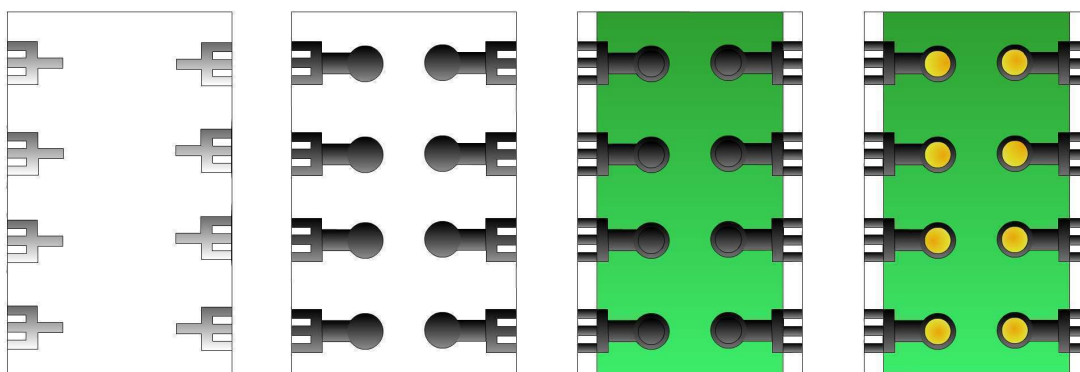


Figura 3.11: Construcción de la plataforma de electrodos sobre mylar. De izquierda a derecha: Deposición de plata, grafito, aislante y oro.

3.6.1 – Limpieza y caracterización de los electrodos de oro

Las láminas planas de oro de 1 cm^2 de área geométrica previo a su utilización fueron sometidas a limpieza sumergiéndolas durante 3 horas en solución piraña (30 % v/v H_2O_2 : H_2SO_4 98 % p/v 1:3). Luego se enjuagaron con agua MilliQ y se sometieron a voltametría cíclica en solución de H_2SO_4 1,8 M a 50 mV s^{-1} desde 0 a 1600 mV versus Ag/AgCl. La superficie electroquímicamente activa fue calculada a partir de la carga obtenida por integración del pico de reducción del óxido de oro [212, 213]. Cuando fue

necesario un procedimiento más exhaustivo de limpieza, los electrodos fueron tratados en solución saturada de permanganato de potasio en medio alcalino (KMnO_4 en 1M NaOH) a 60 °C durante 5 horas.

Las plataformas de multielectrodos recibieron un tratamiento diferente al recién comentado. Los electrodos fueron ciclados, de a uno por vez, 20 veces en HClO_4 1M a 200 mV s^{-1} entre -200 y 1600 mV versus Ag/AgCl (Figura 3.12). Este procedimiento permite limpiar la superficie de oro sin dañar la plataforma plástica y el aislante. Luego, se enjuagaron con agua MilliQ y sometieron a voltametría en una solución de H_2SO_4 1,8 M de forma análoga a lo descrito para las láminas de oro de modo de hallar su factor de rugosidad. En este último caso los electrodos se miden simultáneamente utilizando la celda descrita en la sección 2.5.1 y el multipotenciostato MultiTEQ.

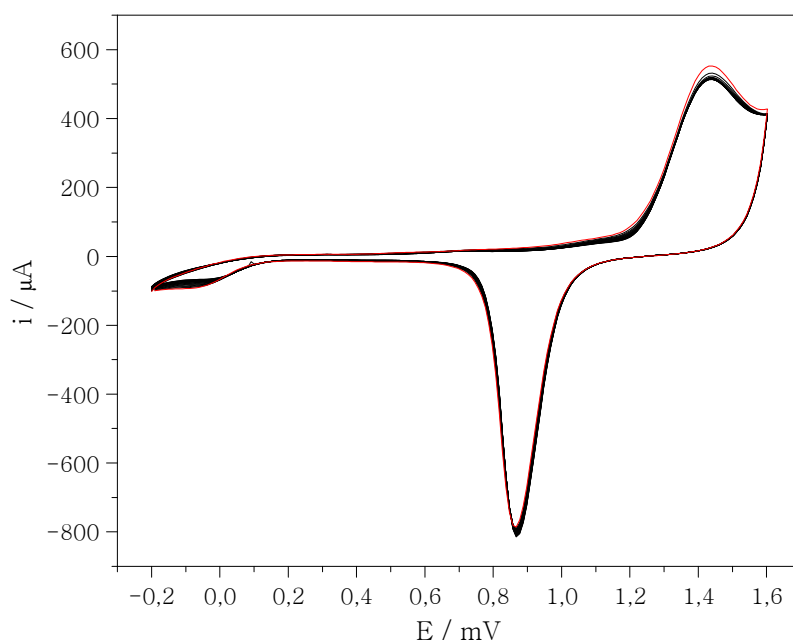


Figura 3.12: Voltametría cíclica para uno de los 8 electrodos del sistema en HClO_4 1M, 20 ciclos a 200 mV s^{-1} . En rojo se muestra el primer barrido.

La voltamperometría en H_2SO_4 evidencia un buen comportamiento electroquímico de las superficies de oro conservando su integridad física luego del tratamiento en ácido perclórico, mostrando además gran similitud con un electrodo de oro macizo (Figura insertada, Figura 3.13). En la placa de 8 electrodos correspondiente a la Figura 3.13 se obtuvieron en promedio valores de rugosidad de $1,7 \pm 0,1$. Valores similares pudieron obtenerse rutinariamente en la preparación de otras placas de electrodos. Nótese la excelente reproducibilidad en el proceso de fabricación de esta

plataforma de electrodos. Estos resultados son muy valiosos en vías del desarrollo de un ensayo de reconocimiento, particularmente un ensayo amperométrico competitivo para la detección de endotoxinas como se presentará en el capítulo 8.

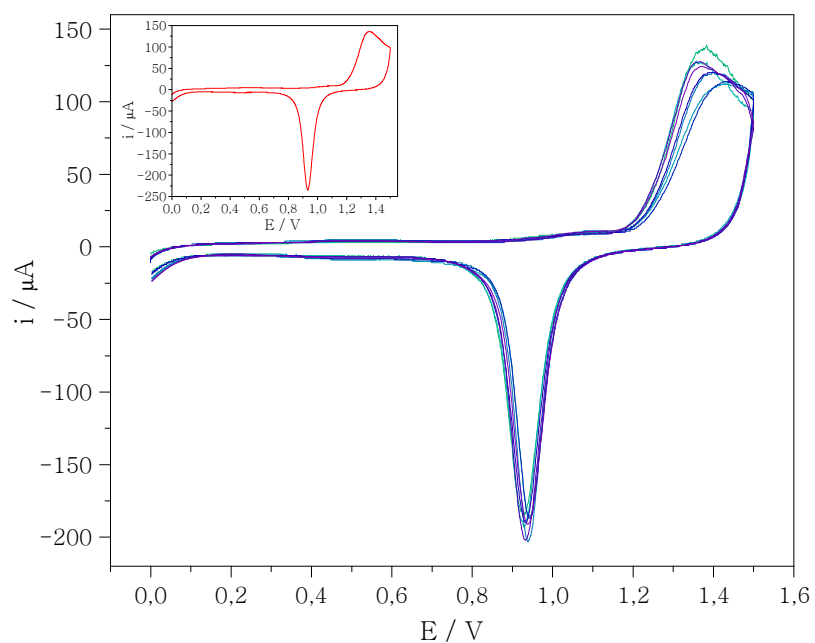


Figura 3.13: Voltametría cíclica para los 8 electrodos de la plataforma multielectrodos en H_2SO_4 1,8 M a 50 mV s^{-1} . Figura insertada: Electrodo de oro macizo de 1 cm^2 de área geométrica.

Capítulo
4

Matriz para Ensayos de
Reconocimiento Molecular



4.1 – Introducción

Los ensayos de afinidad molecular son herramientas importantes en química clínica y en química combinatoria para el desarrollo de nuevas drogas. Los ensayos básicamente involucran un agente de reconocimiento molecular inmovilizado sobre un sustrato transductor con la capacidad de unirse al analito dando lugar a un cambio fisicoquímico, convertido por el transductor en una señal eléctrica procesable. Particularmente, los ensayos basados en afinidad muestran gran potencialidad en la producción de plataformas sensibles, asequibles y descartables para el análisis de una amplia gama de analitos. La mayor parte de los trabajos relacionados con ensayos de afinidad electroquímicos están centrados en mejorar el límite de detección, sin embargo poco se discute sobre los indeseados efectos de la adsorción no específica de biocomponentes presentes en la muestra, ni en la estabilidad de las matrices empleadas.

En su ambiente natural, la mayoría de las biomoléculas interacciones a través de reconocimiento específico, no obstante, presentan una elevada tendencia a adsorberse físicamente sobre sustratos sólidos desprovistos de receptores específicos. Este comportamiento típicamente reduce la eficiencia de muchos ensayos de afinidad, tales como los test western blot, microensayos proteicos, biosensores y ensayos de detección de molécula única [214]; hoy en día, este tema, es aún objeto de investigación en el campo de la química analítica [215–218]. Una plataforma efectiva para un ensayo de reconocimiento debe comportarse como un soporte sólido capaz de inmovilizar al agente de reconocimiento, y al mismo tiempo parecerse al ambiente acuoso donde el analito está presente. Si este objetivo es alcanzado, puede obtenerse, una relación óptima entre el aumento de la unión específica y la reducción de la adsorción no específica.

Dado que la adsorción inespecífica es usualmente impulsada por interacciones de tipo hidrofóbicas entre las biomoléculas y el sustrato sólido, el desempeño del ensayo puede mejorarse reduciendo dicha interacción a través de la modificación de la superficie. Una estrategia ampliamente empleada es el uso de soluciones bloqueantes conteniendo proteínas tales como la albúmina de suero bovino (BSA), la cual resiste la adsorción de otras proteínas. Esta estrategia sufre de problemas asociados con la desnaturalización de la proteína bloqueante, o del intercambio de esta proteína por otras en la solución. Particularmente este tipo de estrategia no es adecuada para prevenir la adsorción inespecífica de lipopolisacáridos dado que presenta una fuerte interacción con endotoxinas [219].

Frecuentemente, en un ensayo electroquímico, el agente de reconocimiento se une a la superficie de oro a través de la formación de un autoensamblado de algún derivado de tipo mercaptano. El oro combina propiedades macroscópicas útiles (por ejemplo, mecánicas, eléctricas y ópticas) con apropiadas propiedades superficiales (por ejemplo, resistencia a la corrosión, bajo desgaste, fácil modificación); por lo tanto se emplea ampliamente en el desarrollo de modelos de superficies para biosensores con una composición química bien definida para una variedad de aplicaciones y técnicas (ópticas, piezoeléctricas y electroquímicas tales como resonancia de plasmón superficial (SPR), microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), impedancia y amperometría).

Los recubrimientos de polisacáridos y polietilenglicoles (PEG) se han empleado ampliamente en una alta variedad de aplicaciones dada su capacidad de resistir la adhesión de proteínas y células. Estas moléculas pueden proveer películas con baja energía superficial con cadenas orientadas en forma aleatoria y altamente hidratadas [220, 221]. Entre los polisacáridos empleados más exitosamente con este propósito se encuentran el dextrano y sus derivados. Por ejemplo, el carboximetildextrán (CMDex) se usa habitualmente en la modificación de oro en transductores para SPR y, actualmente, BIACORE lo utiliza en su sensor de SPR modelo CM5 [222, 223].

Una de las ventajas del CMDex es que los grupos carboxílicos presentes en su estructura pueden modificarse fácilmente dando lugar a una interfase útil para la construcción de dispositivos de reconocimiento molecular, donde el agente de reconocimiento puede incorporarse covalentemente a la superficie. Adicionalmente, la inserción covalente de este polímero a la superficie puede ser conveniente en términos de reproducibilidad y durabilidad de la película depositada. Para nuestro conocimiento, muy poco ha sido reportado sobre la aplicación electroquímica de este tipo de matrices.

En este capítulo, se explora el uso de CMDex70 y CMDex24 combinados con distintos oligo- y polietilenglicoles como matrices sobre electrodos de oro para su aplicación en un ensayo de reconocimiento molecular amperométrico. Se estudia el comportamiento de estas películas frente a la adsorción inespecífica de una proteína de naturaleza hidrofóbica como la neutravidina, como sistema modelo para el desarrollo de una plataforma para ensayos de detección de lipopolisacáridos (LPS). Dada la naturaleza hidrofóbica del lípido A del LPS, la construcción de una superficie capaz de minimizar la adsorción de biocomponente hidrofóbicos constituye una etapa fundamental del proceso de fabricación del ensayo. Con el propósito de evaluar la respuesta de este tipo de sustratos modificados se utiliza un conjugado de neutravidina con peroxidasa de rábano picante (N-HRP). Este derivado proteico ha sido extensamente utilizado en una gran

variedad de ensayos de afinidad basados en detección electroquímica y luminiscente [175, 224, 225]. La Figura 4.1 muestra el ciclo catalítico de la HRP, y su conexión con un electrodo para detección electroquímica utilizando la cupla redox reversible Os(II)/Os(III). En este capítulo se utiliza el mediador Os[(bpy)₂pyCl]PF₆ en su forma reducida.

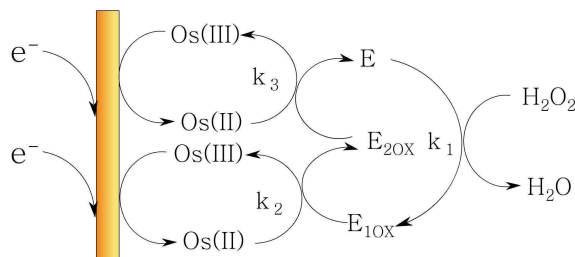


Figura 4.1: Conexión del sistema enzimático de HRP con un electrodo.

Basados en los resultados de elipsometría y amperometría, se analiza la resistencia de la superficie frente a la adsorción de N-HRP considerando la estructura tridimensional que adopta el CMDex sobre la superficie; si bien el CMDex70 produce una estructura densa que reduce drásticamente la adsorción no específica de N-HRP, permite el acceso del mediador redox a la superficie de oro. El sistema compuesto empleando CMDex24 combinado con un polietilenglicol de masa molecular 5000 Da, exhibe un comportamiento similar al de CMDex70. Por otro lado, los sistemas CMDex y CMDex/PEG fueron modificados con biotina, la contraparte de la neutravidina, de modo de evaluar tanto la relación señal específica/señal no específica de la adsorción de N-HRP, así como el efecto de la estructura de la película en la respuesta amperométrica.

4.2 – Experimental

4.2.1 – Reactivos

El mediador redox soluble [Os(bpy)₂(py)Cl]PF₆ (donde bpy = bipyridina y py = piridina) fue sintetizado en nuestro laboratorio como fue previamente reportado [226]. Carboximetildextrán70 (CMDex70 COOH:monómero 1:10) fue sintetizado de acuerdo a lo detallado en la sección 3.3. Cloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), diclorhidrato de cistamina (Cys) y éster succínico de N-hidroxisuccinimida de metoxipolietilenglicol (PEG5000) y etanolamina fueron

provistos por Sigma. Carboximetildextrán₂₄ (CMDex₂₄, Mr 24200 Da, relación COOH:monómero 1:2) y etilenglicol diglicidil éter (PEG174, Mr 174 Da) fueron provistos por Fluka. Biotina-LC-hidracida y neutravidina-peroxidasa de rábano (N-HRP, relación neutravidina/HRP = 1, actividad de HRP = 120 U mg⁻¹ de HRP, determinada espectrofotométricamente siguiendo el procedimiento detallado en 3.5.3) fueron provistas por Pierce. Polietilenglicol diglicidil éter (PEG400, Mr 400 Da) fue adquirido de Polysciences (USA). Ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) fue provisto por Aldrich. Aminodextrán (NH₂Dex, Mr 70000 Da, relación NH₂:monómero 1:18) fue provisto por Molecular Probes.

4.2.2 – Construcción de electrodos modificados

Se emplearon como electrodos de trabajo láminas planas de oro de 1 cm² de área geométrica. La superficie del oro se trató previamente según el protocolo descrito en la sección 3.6.1 y se verificó su limpieza por voltametría cíclica en H₂SO₄ 1,8 M. Posteriormente, los electrodos son sometidos a modificación.

4.2.2.1 – Adsorción de tiol (Au/Cys y Au/MPA)

Los electrodos de oro limpios se sumergieron en una solución 20 mM de diclorhidrato de cistamina (o 25 mM de ácido mercaptopropiónico) en etanol absoluto:agua milliQ en una proporción 9:1 (ó 75:25) durante 2 horas bajo agitación moderada. Posteriormente, se enjuagan primero con etanol absoluto y luego con agua milliQ y se secaron en flujo de nitrógeno. En cada modificación se emplearon soluciones recién preparadas.

4.2.2.2 – Modificación con carboximetildextrán (Au/Cys/CMDex)

El carboximetildextrán se unió a la cistamina a través de la formación de un enlace amida, con la utilización de EDC en presencia de NHS según el esquema de la Figura 4.3.

10 mg mL⁻¹ de CMDex₂₄ o 20 mg mL⁻¹ de CMDex₇₀ fueron disueltos en buffer PIPES 100 mM pH 7,4, conteniendo EDC 150 mM y NHS 27 mM, con agitación durante 10 minutos para activar los grupos carboxílicos presentes en el CMDex. Luego, los electrodos Au/Cys fueron sumergidos y mantenidos en dicha solución toda la noche, a

25 °C con agitación. Cuando ninguna modificación posterior fue llevada a cabo, los electrodos modificados con CMDex (Au/Cys/CMDex24 o Au/Cys/CMDex70) se sumergieron en una solución de etanolamina 1 M para bloquear los grupos carboxílicos activados que no hayan reaccionado. Finalmente, los electrodos se enjuagaron con buffer fosfato 100 mM pH 7,4 con NaCl 150 mM y luego con agua milliQ. Para electrodos modificados con CMDex24-biotina, se empleó el mismo procedimiento descrito para CMDex24.

4.2.2.3 – Modificación con aminodextrán (Au/MPA/NH₂Dex)

La reacción procede de forma similar a la descrita en el punto anterior, con la variante que los grupos carboxílicos que se activan se encuentran en el mercaptano y los grupos aminos que efectúan el ataque nucleofílico en el dextrano (Figura 4.7). Los electrodos Au/MPA se sumergieron en buffer PIPES 100 mM pH 7,4, conteniendo EDC 150 mM y NHS 27 mM, con agitación durante 10 minutos para activar los grupos carboxílicos del MPA. Luego, en la solución de inmersión se disolvió aminodextrán hasta una concentración 20 mg mL⁻¹. La modificación de los electrodos procedió durante toda la noche, a 25 °C con agitación. Concluido el tiempo de reacción, los electrodos se sumergieron en solución de etanolamina 1 M para bloquear los grupos carboxílicos activados sin reaccionar. Posteriormente, los electrodos se enjuagaron con buffer fosfato 100 mM pH 7,4 con NaCl 150 mM y luego con agua milliQ.

4.2.2.4 - Modificación con PEG400 y PEG174 (Au/Cys/CMDex/PEG400 y Au/Cys/CMDex/PEG174)

Los electrodos modificados con carboximetildextrán se sumergieron en una solución 10 mM del correspondiente polietilenglicol (Figura 4.4) en buffer carbonato 150 mM pH 9,5 con NaCl 100 mM durante el período de 3 horas a 25 °C, bajo agitación. Posteriormente, los electrodos se sumergieron en solución de etanolamina 1 M. Concluyendo, los electrodos se enjuagaron con buffer fosfato 100 mM pH 7,4 con NaCl 150 mM y luego con agua milliQ.

4.2.2.5 – Modificación con PEG5000 (Au/Cys/CMDex/PEG5000)

Los electrodos modificados Au/Cys y Au/Cys/CMDex se sumergieron en una solución 5 mM de PEG5000 (Figura 4.4) en buffer PIPES 100 mM pH 7,4 durante 3 horas a 25 °C con agitación. Posteriormente, los electrodos se enjuagaron con buffer fosfato 100 mM pH 7,4 con NaCl 150 mM y luego con agua milliQ.

4.2.2.6 – Modificación de electrodos con biotina (Au/Cys/CMDex/biot y Au/Cys/CMDex/PEG5000/biot)

La unión de biotina a los electrodos modificados con carboximetildextrán (Au/Cys/CMDex) y carboximetildextrán + PEG5000 (Au/Cys/CMDex/PEG5000) se realizó con un procedimiento similar al empleado en la construcción de Au/Cys/CMDex (Figura 4.3) y para la síntesis de CMDex-biotina (Figura 4.11). La biotina se une al carboximetildextrán a través de la activación de los grupos carboxílicos empleando EDC y NHS y posterior conjugación de la biotina-LC-hidracida formando un enlace amida. Los electrodos se sumergieron en buffer MES 50 mM pH 5,5 conteniendo EDC 150 mM y NHS 27 mM, con agitación durante 10 minutos de modo de activar los grupos carboxílicos presentes en el CMDex. Luego, la biotina-LC-hidracida se agregó a una concentración final de 0,3 mM dejando proseguir la reacción durante 1 hora a 25 °C y agitación. Luego, los electrodos modificados se sumergieron en una solución de etanolamina 1 M para bloquear los grupos carboxílicos activados que no hayan reaccionado. Finalmente, los electrodos se enjuagaron con buffer fosfato 100 mM pH 7,4 con NaCl 150 mM y luego con agua milliQ.

4.2.2.7 – Adsorción de N-HRP

La adsorción del conjugado N-HRP fue llevada a cabo sumergiendo los electrodos en solución de N-HRP 25 mg mL⁻¹ en buffer Tris 50 mM pH 7,4 con NaCl 150 mM durante 1 hora a 25 °C (Figura 4.2). Posteriormente, los electrodos se enjuagaron con buffer fosfato 100 mM pH 7,4 con NaCl 150 mM y luego con agua milliQ.

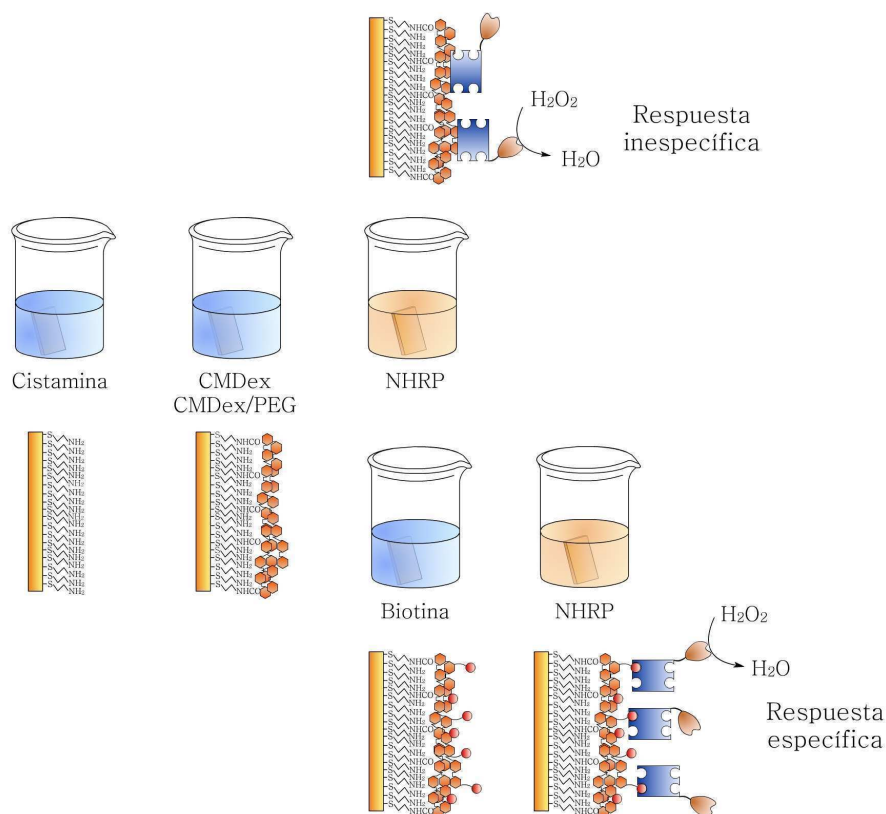


Figura 4.2: Representación esquemática del proceso de modificación de electrodos y adsorción de N-HRP. Al introducir la biotina al electrodo, la contraparte de la neutravidina, puede medirse la respuesta específica del sistema.

4.2.3 – Síntesis de carboximetildextrán-biotina (CMDex24-biotina)

100 mg de carboximetildextrán (CMDex24) se disolvieron en 5 mL de buffer MES 50 mM pH 5,5 conteniendo EDC 30 mM y NHS 5 mM. La mezcla se dejó reaccionar durante 10 minutos con agitación de modo de activar los grupos carboxílicos del polímero. Luego, se agregó 1 mL de biotina-LC-hidracida 20 mg mL⁻¹ en DMSO (Figura 4.11). La reacción se llevó a cabo durante 16 horas a 25 °C con agitación. El producto obtenido se dializó a 25 °C contra agua milliQ durante 48 horas usando membranas de corte molecular 3500, con 4 cambios de líquido de 2 litros cada vez. Posteriormente, la solución se liofilizó. El sólido obtenido se conservó a -20 °C hasta su uso. La relación de modificación biotina:CMDex24 fue determinada empleando el ensayo para la cuantificación de biotina, EZ Biotin Quantitation Kit, provisto por Pierce.

4.2.4 – Mediciones electroquímicas

Las mediciones electroquímicas se realizaron empleando un sistema estándar de tres electrodos junto con un potenciostato (TEQ-02). El sistema consiste en un electrodo de trabajo, una malla de platino como contraelectrodo y un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia. Los electrodos de trabajo se prepararon el mismo día de su implementación.

4.2.4.1 – Desorción reductiva de cistamina

Los electrodos modificados con cistamina (Au/Cys) se enjuagaron con etanol absoluto y agua milliQ y se secaron con flujo de nitrógeno.

Se registraron las voltametrías cíclicas en solución de hidróxido de potasio 0,5 M barriendo el potencial entre $-0,2\text{ V}$ y $-1,2\text{ V}$ vs. Ag/AgCl a 100 mV s^{-1} . Previo a cada experimento la solución se desoxigenó durante 20 minutos con flujo de nitrógeno.

Los electrodos se normalizaron considerando el factor de rugosidad. El cálculo de rugosidad se realizó de acuerdo a lo detallado en 3.6.1.

4.2.4.2 – Mediciones cronoamperométricas

Las medidas cronoamperométricas se realizaron manteniendo el potencial del electrodo de trabajo a 50 mV vs. Ag/AgCl. Los electrodos funcionalizados fueron medidos inmediatamente luego de su preparación. Para todos los ensayos descriptos, los electrodos se enjuagaron e introdujeron en la celda electroquímica conteniendo buffer Tris 50 mM pH 7,5, KNO_3 $0,2\text{ M}$. El mediador redox $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCl}]\text{PF}_6$ se agregó de modo de obtener una concentración final de $40\text{ }\mu\text{M}$. El electrodo modificado se conectó al potenciostato, dejando equilibrar con la solución; las corrientes de fondo fueron siempre menores a 10 nA . Luego, se agregó peróxido de hidrógeno a una concentración final de $0,9\text{ mM}$; inmediatamente se observó un cambio en el valor de la corriente, que alcanzó un valor constante, debido a la corriente catalítica catódica producida, la cual es proporcional a la concentración superficial de N-HRP (Figura insertada, Figura 4.6). Para los electrodos modificados con carboximetildextrán, las señales obtenidas se normalizaron por el área geométrica, dado que para experimentos que involucran especies electroquímicas en solución, y tiempos del orden de los minutos, el factor de rugosidad no tiene efecto [227].

4.2.5 – Mediciones elipsométricas

La elipsometría es un método óptico que registra el cambio en la polarización de luz elípticamente polarizada, cuando ésta se refleja sobre la superficie de una muestra. Si la superficie está ópticamente modificada, puede detectarse el cambio asociado con la polarización. El índice de refracción, n_f , y el espesor óptico, d_f , de la película depositada sobre la superficie puede estimarse por los cambios en los ángulos elipsométricos [228, 229].

Las medidas elipsométricas para determinar la cantidad de CMDex ($\Gamma_{dexán}$) y su espesor (d_f) sobre la superficie del electrodo, fueron realizadas en nuestro grupo por la Dra. Priano. Los detalles sobre la técnica y las metodologías de trabajo empleadas pueden encontrarse en su tesis doctoral [122] y en su publicación de Analytical Chemistry [148].

Las mediciones se llevaron a cabo utilizando un elipsómetro marca Sentech modelo SE 400 de analizador rotante, equipado con un láser de gas He/Ne ($\lambda = 632.8$ nm), 10 mW (máxima potencia de salida). Como sustratos se utilizaron obleas de Si provistas por Motorola sobre las cuales se depositaron 20 nm de Ti y 200 nm de Au. Las medidas *in situ* se realizaron a un ángulo fijo de 70°.

4.2.6 – Ángulo de contacto

Las mediciones de ángulo de contacto se realizaron en el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) siguiendo las especificaciones TAPPI 565pm/96.

4.3 – Resultados

El uso de superficies de oro como soporte para la inmovilización de agentes de reconocimiento por adsorción directa sobre el metal, se ha reportado en un gran número de trabajos [230, 231]; sin embargo, para este tipo de configuración surgen varios inconvenientes, tales como la orientación aleatoria del agente de reconocimiento, y la adsorción no específica de otros biocomponentes presentes en la muestra. Para evaluar con precisión una interacción biomolecular específica, la adsorción no específica debe ser minimizada, dado que esa adsorción puede dar lugar a interpretaciones erróneas. Una estrategia generalmente empleada para mejorar la orientación del agente de reconocimiento involucra el uso de reactivos bifuncionales del tipo X-R-Y, donde X

e Y son diferentes grupos funcionales, de los cuales uno se une a la superficie del electrodo y el otro al agente de reconocimiento. Los mercaptanos son opciones interesantes dada la habilidad del tiol para unirse a la superficie de oro, y al mismo tiempo por la gran variedad de derivados disponibles conteniendo grupos funcionales fácilmente derivatizados.

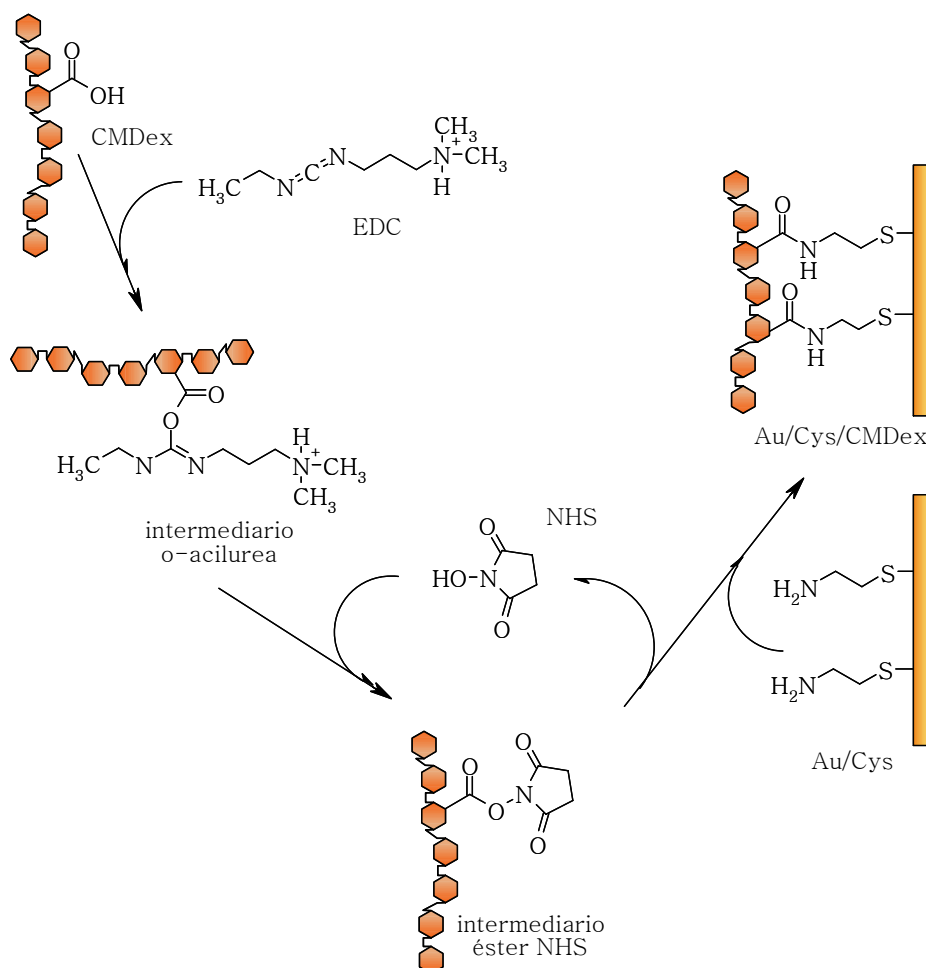


Figura 4.3: Formación de un enlace amida a partir de la reacción del ácido carboxílico del CMDex y la amina primaria de la cistamina, con la utilización de EDC y NHS. La formación del éster de NHS intermediario incrementa la eficiencia de la reacción con EDC.

Adicionalmente, la modificación de oro tanto con dextrano como con polietilenglicoles ha sido previamente reportada usando alcanotioles de cadena larga. Por ejemplo, Whitesides y colaboradores estudiaron la adsorción no específica de proteínas sobre películas de HS(CH₂)₁₁(OCH₂CH₂)_mOH sobre oro [232]. Löffas desarrolló plataformas para SPR combinando CMDex con alcanotioles de 16 C [233]. Aunque estas modificaciones producen películas capaces de evitar la adsorción no específica de

proteínas sobre oro, la posibilidad de que pueda establecerse un proceso reversible de transferencia de electrones entre el oro y especies electroactivas en solución, en estos casos se ve dificultada, resultando estas superficies no adecuadas para ensayos electroquímicos.

En este capítulo, todas las plataformas involucran la incorporación de un reactivo bifuncional, la cistamina, la cual da lugar a la adsorción de 2 aminoetanotioles sobre la superficie del oro. Posteriormente, se incorpora CMDex (Figura 4.3) o CMDex combinado con oligo- o polietilenglicoles (Figura 4.4) a través de la formación de un enlace con los grupos aminos que expone la cistamina.

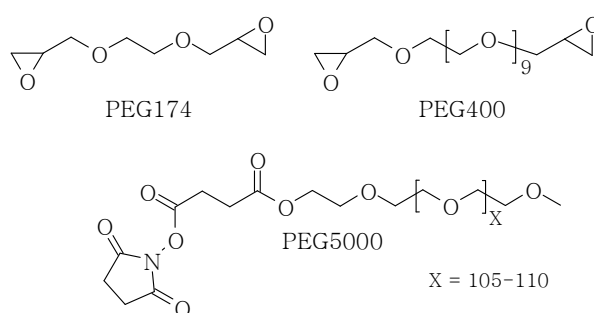


Figura 4.4: Polietilenglicoles empleados en la preparación de electrodos modificados.

La eficiencia del proceso de adsorción de cistamina fue evaluado estudiando su desorción electroquímica en medio básico. La Figura 4.5 muestra el voltamograma para un electrodo modificado con cistamina en condiciones alcalinas. Pueden observarse tres picos correspondientes a la desorción reductiva del tiol sobre distintos dominios cristalográficos del oro [234, 235], mostrando un comportamiento similar al reportado por El-Deab y colaboradores [236]. Estos picos pueden asignarse a los dominios de oro (111), (100) y (110); la diferencia en los potenciales puede atribuirse a las diferentes fuerzas de enlace del tiol con el correspondiente dominio. El cubrimiento promedio, calculado a partir de los datos obtenidos de 5 electrodos distintos, resultó ser de $(5,7 \pm 0,3) \times 10^{-10}$ moles cm^{-2} , lo que representa el cubrimiento completo de la superficie.

El cubrimiento completo del oro con cistamina no afecta el comportamiento de la N-HRP respecto de su adsorción inespecífica, como puede observarse en la Figura 4.6. La adsorción no específica de N-HRP sobre oro, y sobre oro modificado con cistamina, se manifiesta por la corriente catalítica observada en presencia de peróxido de hidrógeno y $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{py})\text{Cl}]^+$, como muestra la Figura 4.1. La adsorción de la proteína

en las distintas superficies puede entenderse asumiendo distintos tipos de interacciones. Aunque Au y Au/Cys presentan diferentes ángulos de contacto con agua (44° y 9° , respectivamente), en ambos casos la cantidad de proteína adsorbida es similar. En el primer caso, la superficie de oro limpio rápidamente atrae materia orgánica. De hecho, el elevado ángulo de contacto se debe a la adsorción de una submonocapa de hidrocarburos presentes en el aire ambiental dando lugar a una superficie de naturaleza hidrofóbica [237]. En cambio, la adsorción sobre el electrodo Au/Cys puede atribuirse a la presencia de grupos dadores de puente hidrógeno, como ha sido reportado para superficies de oro modificadas con diferentes poliaminas, todas ellas presentando una alta adsorción inespecífica de proteínas comparado con los mismos polímeros acilados [238].

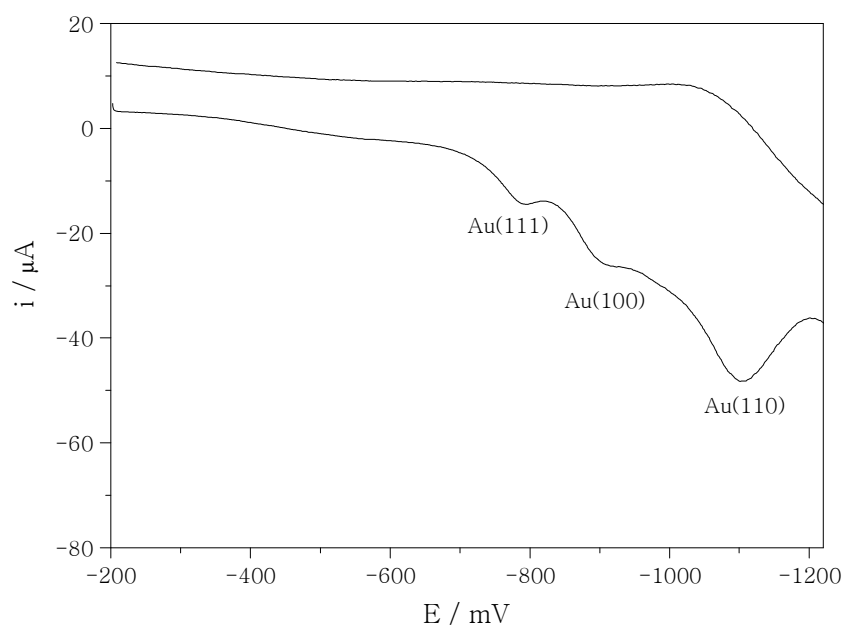


Figura 4.5: Desorción reductiva de cistamina de oro policristalino en KOH 0,5 M. Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1} .

Para que un polímero sea resistente a la adhesión de proteínas y células, debe ser neutro, estar altamente hidratado, densamente empacado y ser conformacionalmente móvil [239]. La efectividad del PEG para lograr estas características está comprobada. Los recubrimientos de polisacáridos deberían ser similares a los de polietilenglicoles dado que los polisacáridos también pueden proveer películas neutras, con cadenas altamente hidratadas y orientadas al azar. Un gran número de trabajos han mostrado que las superficies modificadas con polisacáridos pueden prevenir la adsorción no específica de proteínas. Löfås y Johnson [222]

desarrollaron una forma efectiva de evitar la adsorción inespecífica en sensores de SPR, por modificación con carboximetildextrán, generando una superficie donde, en principio, las proteínas no se adsorben. Usando el mismo criterio, se han modificado electrodos Au/Cys con CMDex24 y CMDex70. La adsorción de la N-HRP fue evaluada para cada una de estas superficies. En la Figura 4.6, se observa que la corriente catalítica disminuye para los electrodos modificados con CMDex24 y CMDex70 respecto de electrodos Au/Cys. Por lo tanto, la adsorción de N-HRP sobre cistamina es mayor a la correspondiente sobre las películas de CMDex. Aunque la reducción de la adsorción proteica se reduce significativamente para ambos polisacáridos, en el caso de CMDex70 es más notable.

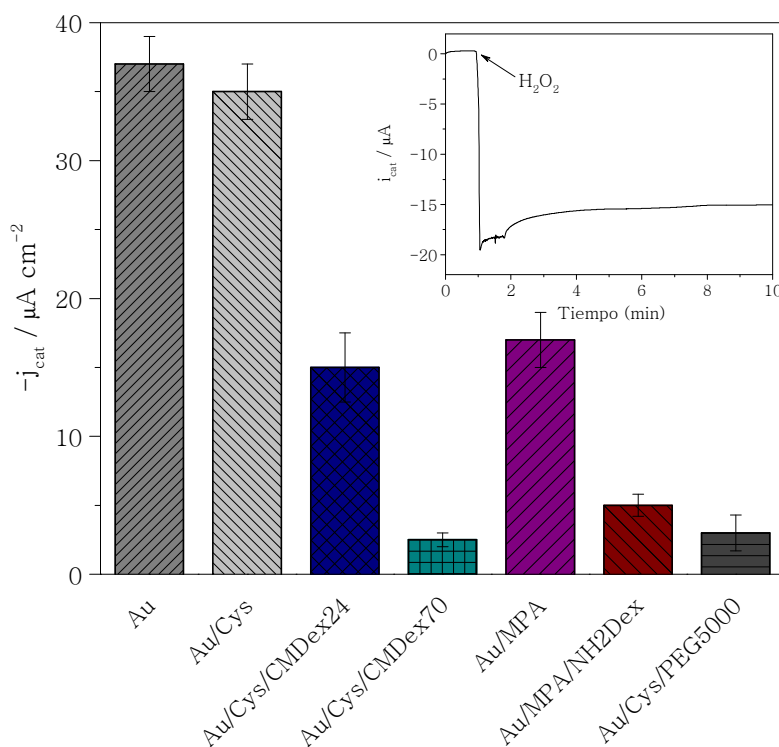


Figura 4.6: Corriente catalítica debida a la adsorción no específica de N-HRP sobre diferentes superficies. Figura insertada: Medición cronoamperométrica para un electrodo Au/Cys/CMDex24. La flecha indica el momento del agregado de peróxido de hidrógeno.

Las propiedades ópticas de la película hidratada de CMDex utilizado en este capítulo se muestran en la Tabla 4.1. A partir de estos resultados, podemos concluir que el CMDex70 se encuentra inmovilizado como una película densamente empacado con una concentración cinco veces mayor que la de CMDex24. La forma en la cual el

dextrano y sus derivados pueden enlazarse a una superficie ha sido previamente estudiado [240]. Imaginando a la molécula como una hebra, ésta puede unirse a la superficie por su lado (configuración horizontal) o por su extremo (configuración vertical) [239]. En nuestro caso particular, el CMDex se unió covalentemente a la superficie del sustrato (Au/Cys); considerando el camino de reacción empleado y la naturaleza química del polímero (COOH:monómero 1:2 y 1:10 para CMDex24 y CMDex70 respectivamente) es razonable asumir que el polímero adquiere la configuración horizontal.

	CMDex24	CMDex70
n	1,340	1,374
d (nm)	71	125
Γ (pmol cm ⁻²)	18	51
C_{CMDex} (g cm ⁻³)	0,06	0,29

Tabla 4.1: Resumen de las propiedades de las películas hidratadas de CMDex24 y CMDex70 (mediciones elipsométricas *in situ*).

En primera aproximación, considerando que la adsorción de la proteína es muy sensible a la disponibilidad de sitios expuestos de la superficie del Au u Au/Cys, la disminución de la adsorción de N-HRP sobre la película de CMDex70 respecto de la de CMDex24 (Figura 4.6), la podemos atribuir a una mayor cantidad de polímero inmovilizado presente en la película, apenas más gruesa para el caso de CMDex70, y por lo tanto a una mayor densidad de empaquetamiento. Los resultados presentados aquí indican que las moléculas de CMDex24 cubren de manera menos eficiente la superficie, dejando sitios donde puede darse la interacción de la proteína con grupos aminos no modificados, los cuales corresponden a un 48% de la cistamina adsorbida inicial, de acuerdo con los resultados de nuestro grupo [148].

Otro de los efectos a considerar en relación con la adsorción de proteínas es el tipo de grupos funcionales presentes en la superficie, que en el caso de los electrodos modificados con cistamina, son grupos aminos. Para analizar esto, la superficie de oro fue modificada con ácido mercaptopropiónico (MPA), y con aminodextrán (NH₂Dex, 70 KDa) respectivamente. De forma similar a lo que sucede con cistamina, MPA da lugar a un completo cubrimiento de la superficie de oro, $(6,9 \pm 0,4) \times 10^{-10}$ mol cm⁻². Sin

embargo, la corriente catalítica observada debida a la adsorción no específica de N-HRP sobre los electrodos Au/MPA indica una menor adsorción respecto a los electrodos modificados con cistamina (Figura 4.6). Cuando los electrodos de Au/MPA son modificados con NH₂Dex (Au/MPA/NH₂Dex), el valor de corriente disminuye aproximándose al valor obtenido para CMDex70, más que a aquel correspondiente a CMDex24, sugiriendo que a mayor masa molecular del dextrano mayor es su efectividad como matriz capaz de rechazar la adsorción de proteínas.

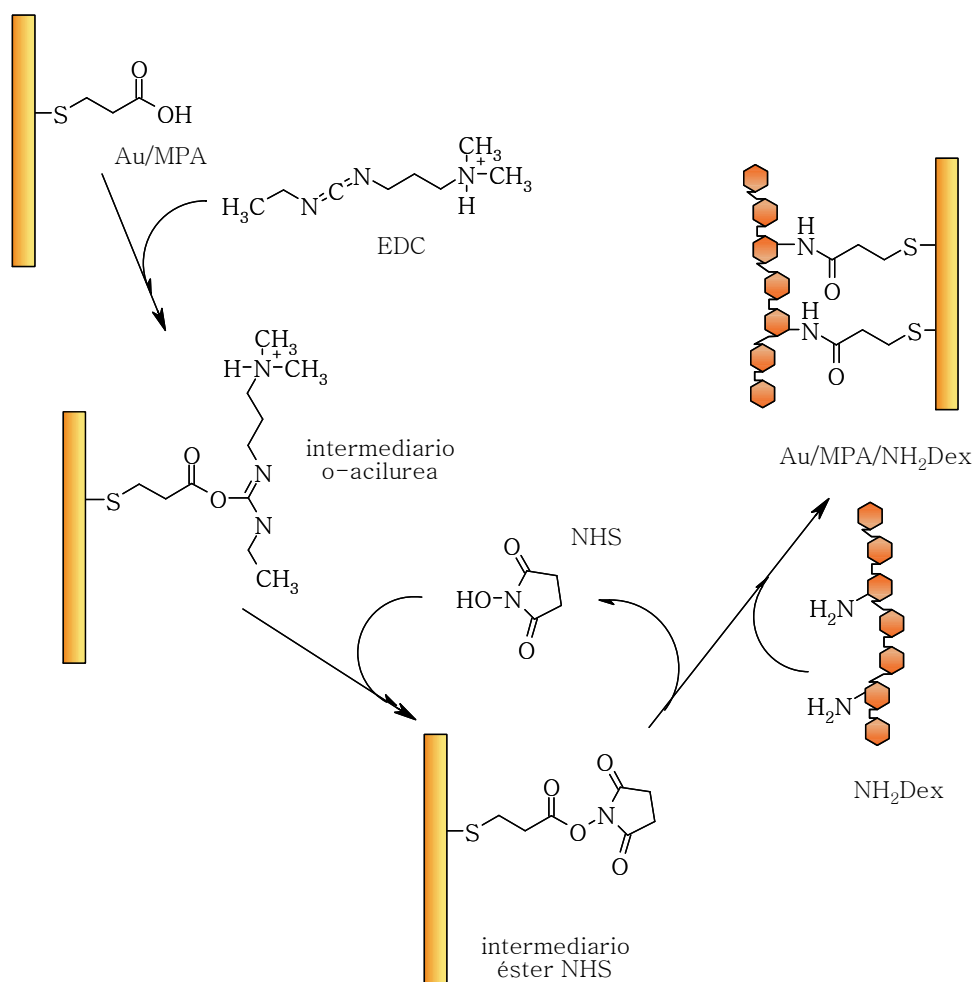


Figura 4.7: Esquema de la modificación de electrodos de oro con ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) y aminodextrán (NH₂Dex) con la utilización de EDC y NHS.

Un análisis más fino de estos resultados sugiere que los grupos funcionales presentes en el dextrano también poseen un efecto sobre la adsorción de la N-HRP, dado que la corriente observada sobre NH₂Dex es el doble que el valor observado para CMDex70, pese a que el número de grupos funcionales aminos por monómero de glucosa es relativamente bajo (1:18). El mismo comportamiento es observado cuando

Au/Cys, que deja grupos aminos accesibles, se compara con Au/MPA que contiene grupos carboxílicos. Estos resultados sugieren que la adsorción de N-HRP se ve favorecida cuando los grupos aminos sobre la superficie del sustrato se exponen a la solución.

La amidación de los grupos carboxílicos en el CMDex no afecta la adsorción de N-HRP. De hecho, los electrodos modificados con CMDex, donde los grupos carboxílicos remanentes se hicieron reaccionar con etanolamina, mostraron un comportamiento similar cuando se los comparó con aquellos que no recibieron ese tratamiento.

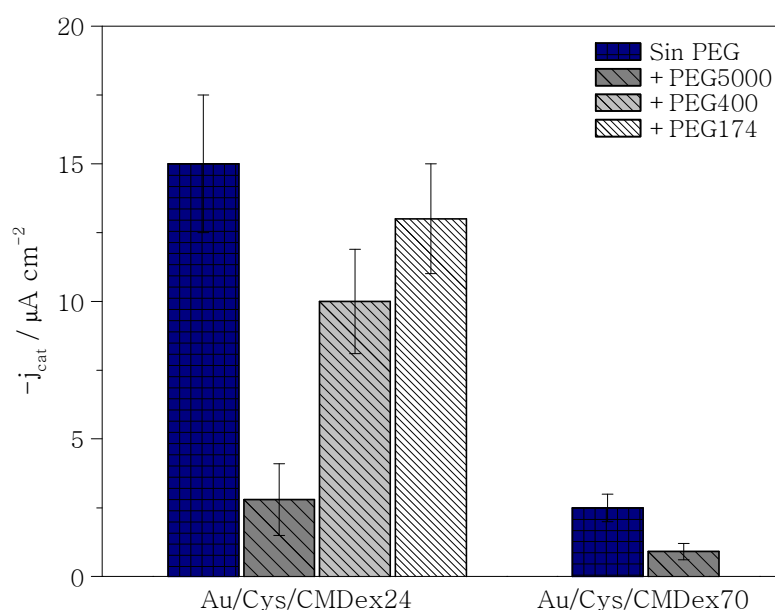


Figura 4.8: Corriente catalítica debida a la adsorción no específica de N-HRP sobre superficies compuestas de CMDex24 combinado con PEG5000, PEG400 y PEG174 o CMDex70 combinado con PEG5000. A modo de comparación se muestran resultados para electrodos Au/Cys/CMDex24 y Au/Cys/CMDex70 sin modificación posterior.

Toda esta información apunta a que la adsorción de N-HRP se ve facilitada por la exposición a la solución de los grupos aminos sobre la superficie de oro. Utilizando derivados de polietilenglicoles, puede reducirse la concentración superficial de los grupos aminos que hayan quedado sin reaccionar. En este caso hemos seleccionado al PEG5000, dado que posee una masa molecular conveniente [218], y que su forma activada, éster N-hidroxisuccinimídico, permite la modificación del electrodo en un sencillo paso de reacción. La Figura 4.8 muestra los resultados que se obtienen luego de la modificación de Au/Cys/CMDex24 y Au/Cys/CMDex70 con PEG5000 (columnas

gris oscuro), indicando una importante disminución de la adsorción inespecífica de N-HRP. Por comparación, Au/Cys/CMDex24 fue también modificado con otros dos polietilenglicoles de distinta masa molecular, PEG400 y PEG174, a través de sus grupos epóxidos, mostrando ningún cambio significativo en la corriente catalítica. Estos grupos epóxidos reaccionan tanto con los grupos aminos en la superficie del sustrato, así como con los grupos carboxílicos en el CMDex, formando grupos aminos secundarios en un caso y ésteres en el otro. El hecho de que no pueda observarse un cambio significativo en el valor de la corriente cuando se utiliza PEG400 y PEG174, como ha sido descrito, puede deberse, en parte, a que el grupo amino secundario que se genera conserva su capacidad como donador de puente hidrógeno. Estos resultados evidencian que no solo es importante la presencia de moléculas en la superficie con elevada hidratación y volumen molar de exclusión [220], sino que también la acilación de los grupos aminos es un factor influyente.

Un ejemplo de una aplicación típica de este tipo de plataformas en un ensayo de reconocimiento electroquímico es la modificación de superficies con anticuerpos, o proteínas de reconocimiento, a través de la formación de un enlace covalente con los grupos aminos de los residuos de lisina. Los electrodos modificados con CMDex fueron modificados con hidracida de biotina a través de la formación de un enlace amida mediado por EDC y NHS, con el objetivo de evaluar la capacidad de reconocimiento específico de esta plataforma. La Figura 4.9 compara el comportamiento obtenido para cuatro plataformas diferentes, las cuales fueron evaluadas con, y en ausencia, de la contraparte específica, biotina. Con este propósito, los electrodos Au/Cys/CMDex24, Au/Cys/CMDex24+ PEG5000, Au/Cys/CMDex70 y Au/Cys/CMDex70+ PEG5000, y todos ellos con biotina unida covalentemente, fueron incubados en presencia de N-HRP. La mejor relación señal específica/señal no específica se obtiene para CMDex70 (calculada como la relación entre la corriente catalítica observada para los electrodos CMDex-biotina, específica, sobre la corriente observada para los electrodos sin biotina, no específica). La adición de PEG a los electrodos modificados con CMDex24 mejora esta relación, mientras que en el caso de CMDex70 la relación se mantiene prácticamente constante, aunque el valor de corriente disminuye. Por lo tanto, CMDex y CMDex24+ PEG5000 serían las plataformas recomendadas para aplicar en un ensayo de reconocimiento molecular. Estos resultados muestran que el aumento de la densidad y espesor de la película reducen la adsorción inespecífica y específica. De acuerdo con Piehler y colaboradores [240], los dos tipos de interacciones se ven afectadas por la disminución de la movilidad de la molécula a reconocer, en este caso N-HRP, dentro del

hidrogel, lo cual disminuye a medida que la estructura de la película se vuelve más compacta. También, esto afecta la capacidad de unión del agente de reconocimiento, dado que una estructura más compacta implica una menor movilidad, disminuyendo, por lo tanto, su habilidad de orientarse apropiadamente para capturar al analito [218, 240].

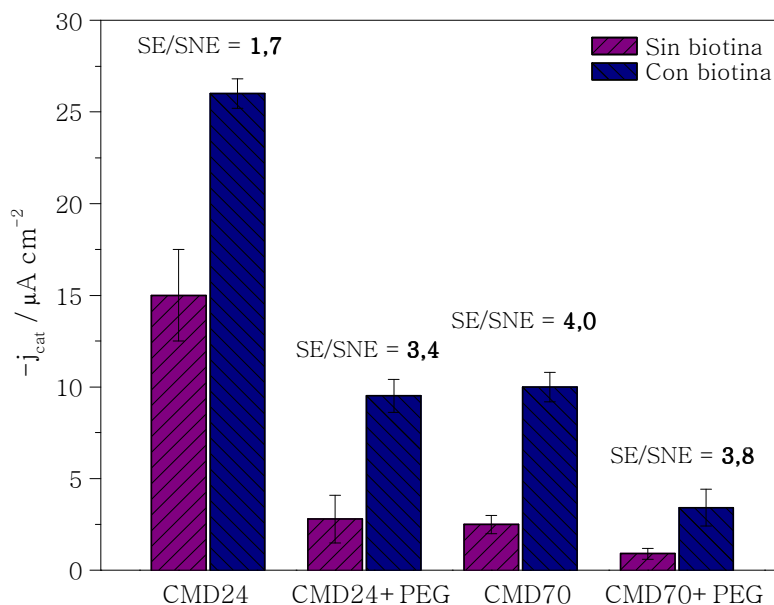


Figura 4.9: Corriente catalítica observada para diferentes electrodos modificados debida a la adsorción no específica y específica de N-HRP. SE/SNE corresponde a la relación señal específica/señal no específica.

La estructura compacta que se obtiene con estos polímeros puede dificultar el acceso de la cupla redox a la superficie del electrodo. Para evaluar tal efecto, se investigó el desempeño electroquímico del mediador redox y se determinó su coeficiente de difusión (sección 3.4) en electrodos Au/Cys/CMDex24+ PEG5000 y Au/Cys/CMDex70 y se comparó con electrodos de oro sin modificar (Figura 4.10). Para los tres sistemas analizados se obtuvieron valores de coeficiente de difusión similares (Tabla 4.2). Por lo tanto, la disminución en la corriente catalítica posterior a la incubación con N-HRP, observada en los electrodos modificados con CMDex (Figura 4.6), puede atribuirse a un menor grado de adsorción, y no a un bloqueo del proceso de transferencia de electrones entre el oro y el mediador redox.

Finalmente, se analizaron los valores de corriente catalítica obtenidos en los experimentos previos examinando el comportamiento de estado estacionario de los electrodos enzimáticos. Con este propósito, se evaluó la respuesta catalítica amperométrica de la enzima redox inmovilizada, como una capa delgada, sobre la

superficie del electrodo con un mediador redox presente en solución según ha sido descrito en la sección 2.2.5. La expresión para la corriente catalítica puede describirse usando la ecuación 2.16, aplicable para el mediador en su forma reducida (Os(II)).

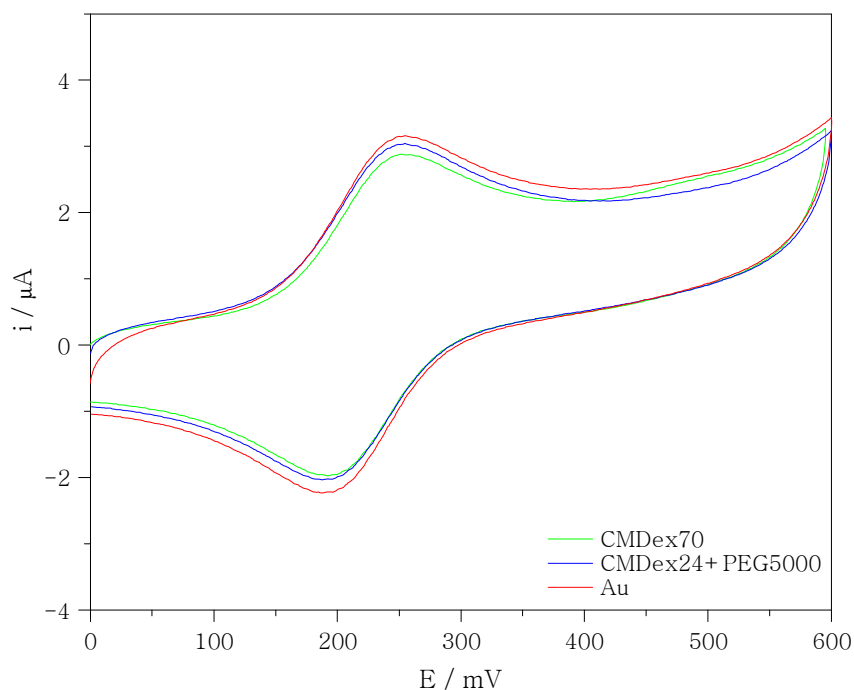


Figura 4.10: Voltametría cíclica para un electrodo de oro y electrodos modificados. $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCl}]^+$ 40 μM en buffer Tris 50 mM pH 7,5 + KNO_3 0,2 M. Velocidad de barrido: 10 mV s^{-1} .

Electrodo	Coeficiente de difusión (D_0) ($10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)
Au	4,3
Au/Cys/CMDex24+ PEG5000	3,8
Au/Cys/CMDex70	2,7

Tabla 4.2: Coeficiente de difusión de $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCl}]^+$ determinado para distintas plataformas de electrodos. Ver detalles en la sección 3.4.

La determinación del paso determinante de la velocidad del ciclo catalítico, k_3 , se realizó por espectrofotometría de estado estacionario, como ha sido previamente reportado [128]. El decaimiento de la concentración de $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCl}]\text{PF}_6$ se monitoreó por la variación de la banda de absorción a 500 nm del osmio (II). Teniendo en cuenta que una monocapa de N-HRP produce un cubrimiento de aproximadamente 3,7 pmol

cm^{-2} [175], y considerando el valor de k_3 , $3,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, obtenido usando la técnica espectrofotométrica de estado estacionario, puede predecirse una corriente catalítica de $44 \mu\text{A cm}^{-2}$ usando el modelo propuesto en la ecuación 2.16. Si comparamos este valor con los obtenidos experimentalmente, podemos inferir que, sobre Au y Au/Cys, N-HRP es capaz de formar prácticamente una monocapa (37 y $35 \mu\text{A cm}^{-2}$, respectivamente); la diferencia con el valor calculado (aproximadamente un 20 %) puede atribuirse tanto a la desnaturalización de la enzima en la superficie del electrodo como a posibles procesos de inhibición [175]. Para los electrodos modificados con diferentes dextranos (Figuras 4.6 y 4.8), las corrientes disminuyen a valores por debajo de $15 \mu\text{A cm}^{-2}$; este hecho evidencia que la película de polisacárido funciona como una membrana permitiendo el paso de pequeñas moléculas como el mediador, y evitando la adsorción de moléculas voluminosas, como N-HRP u otras biomoléculas.

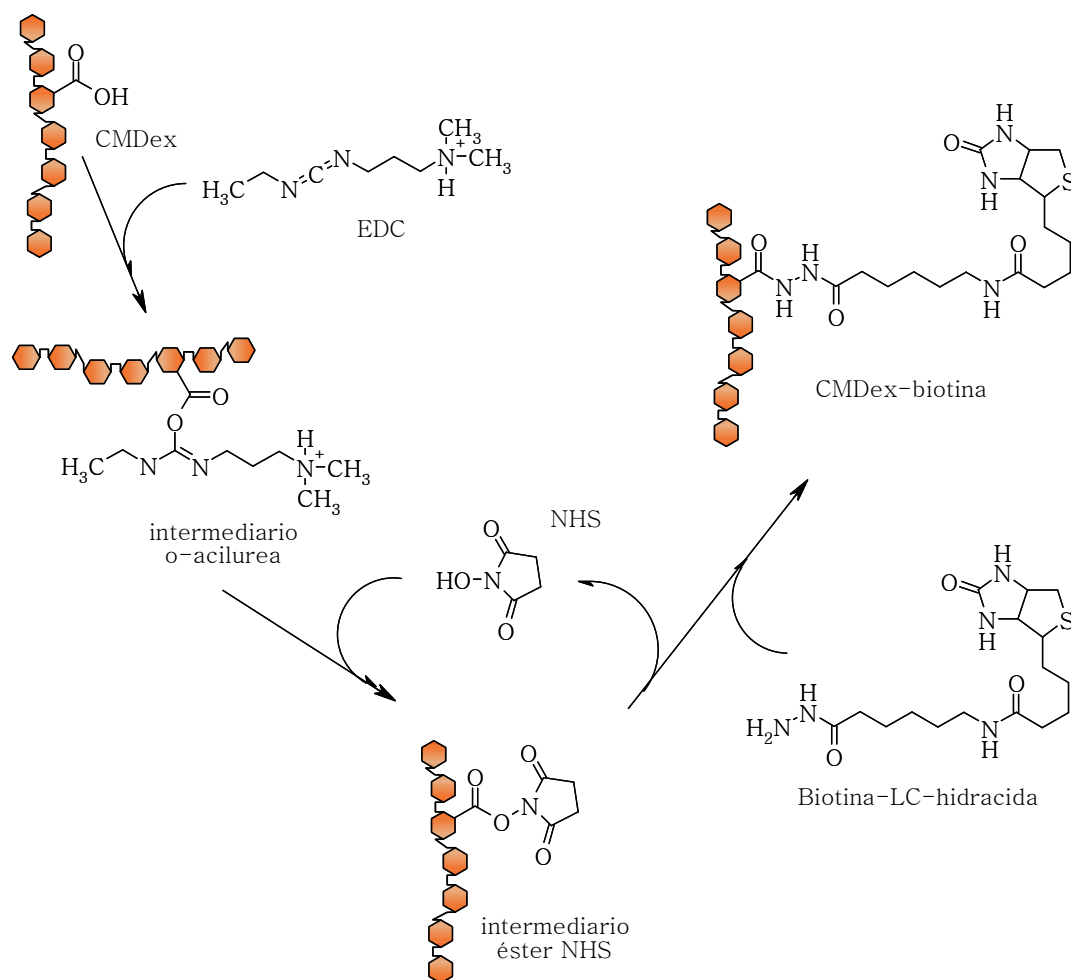


Figura 4.11: Síntesis de CMDex-biotina. Formación de un enlace amida a partir de la reacción del ácido carboxílico del CMDex y el grupo hidracida del derivado de la biotina, con la utilización de EDC y NHS.

En el caso de los electrodos modificados con biotina (Figura 4.9), se observa un aumento en la corriente respecto de aquellos electrodos sin biotina, sin embargo las corrientes son inferiores a lo correspondiente para una monocapa ($44 \mu\text{A cm}^{-2}$). Este fenómeno puede atribuirse tanto, a una baja concentración de biotina en el electrodo modificado como al hecho de que la N-HRP es incapaz de penetrar a través de la película de polisacárido. Para descartar el déficit de biotinas en la película como una razón para las bajas corrientes observadas, se sintetizó un derivado de CMDex24 con biotina (Figura 4.11), rindiendo una estequiometría de 3 biotinas cada 24 kDa. Luego, un electrodo de oro fue modificado con este nuevo polímero e incubado con N-HRP en un procedimiento análogo al resto de los electrodos ensayados. En estas condiciones se obtuvo una corriente catalítica de $(26 \pm 3) \mu\text{A cm}^{-2}$. Teniendo en cuenta la estequiometría del polisacárido modificado y los resultados obtenidos por elipsometría para CMDex24, puede estimarse la incorporación al electrodo modificado de 54 pmol cm^{-2} de biotina. Esta concentración de biotina es capaz de unir más de una monocapa de N-HRP, sin embargo esto no se observa, lo que sugiere que la N-HRP solo puede unirse a las biotinas que se hayan bien expuestas en la superficie del hidrogel.

4.4 – Sumario

El uso de alcanotioles de cadena corta en combinación con derivados del dextrano, capaces de formar películas densamente empacadas, genera superficies donde los mediadores redox pueden mantener su comportamiento reversible y, al mismo tiempo, disminuye la adsorción inespecífica de proteínas.

El carboximetildextrán es una molécula muy conveniente para evitar la adsorción no específica, dado que su alto número de grupos carboxílicos asegura su unión a la superficie del sustrato, y permite la unión al agente de reconocimiento, usando el mismo paso de reacción.

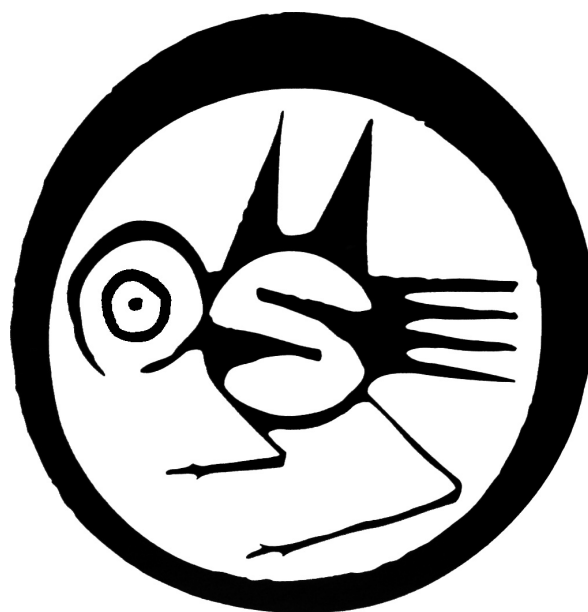
La biotina puede ser reconocida específicamente con una relación señal específica/señal no específica igual a 4. Esta relación podría mejorarse si el agente de reconocimiento presentase una cadena más hidrofílica y conformacionalmente más móvil, (por ejemplo, la elección de un derivado de la biotina conteniendo una molécula espaciadora hidrofílica).

El material compuesto CMDex+PEG5000 es también efectivo respecto a la prevención de la adsorción no específica, permitiendo el proceso reversible de transferencia de electrones para mediadores pequeños. Los electrodos Au/Cys

modificados solo con PEG5000 también muestran una baja adsorción inespecífica de N-HRP (Figura 4.8), pero debido a su estructura no pueden hacerse modificaciones posteriores en forma sencilla. El uso de polietilenglicoles bifuncionales permitiría superar este inconveniente, sin embargo su síntesis es más complicada si la comparamos con CMDex.

Capítulo *5*

Conjugados de LPS:
Oxidación con Periodato



5.1 – Introducción

En un trabajo previo [148], Priano y Battaglini han propuesto un ensayo competitivo electroquímico empleando electrodos de oro modificados con una proteína de unión a endotoxinas (ENP) recombinante de *Saccharomyces Cerevisiae* como elemento de reconocimiento. En este ensayo, el LPS en la muestra competía con un conjugado comercial (AlerCHEK Inc., Portland, Maine, USA) de LPS con HRP por los sitios específicos sobre la superficie. Si bien el sistema desarrollado era capaz de detectar LPS en muy bajas concentraciones ($0,2 \text{ UE mL}^{-1}$), presentaba algunas limitaciones, principalmente relacionadas con la baja actividad endotóxica del conjugado de LPS-HRP ($0,012 \text{ UE ng}^{-1}$), comparado con un valor típico para LPS (1 UE ng^{-1}). Dado que la actividad endotóxica del LPS se correlaciona con su afinidad hacia ENP [241], se veía afectaba la sensibilidad del ensayo.

En este capítulo y en los capítulos 6 y 7, se propone mejorar la calidad de los conjugados de LPS. En un ensayo competitivo, es importante que las propiedades biológicas y la capacidad de unión del LPS no se vean afectadas por la conjugación; por otro lado, la molécula que se utiliza como sonda debe estar presente en el conjugado en una buena relación y ser estable.

Dada la complejidad de la molécula, la síntesis de conjugados de LPS no es simple. Las endotoxinas en solución no constituyen una muestra homogénea, y en las concentraciones necesarias para la síntesis forman agregados de alta masa molecular [12, 17, 22]. Para preservar la porción activa del LPS, la unión covalente de la sonda se llevó a cabo en la región del antígeno O. A diferencia de algunos trabajos que involucran la síntesis de conjugados de LPS [153, 242], en este caso es necesario que, en promedio, todas las moléculas de LPS estén marcadas para evitar pérdidas de sensibilidad en el ensayo competitivo.

Mediante la oxidación controlada con periodato de sodio pueden generarse, sobre la región sacárida del LPS, grupos aldehídos capaces de reaccionar con las sondas seleccionadas a través de sus grupos nucleofílicos [243]. Teniendo en mente la potencialidad del sistema biotina-avidina, se sintetizó un conjugado de LPS con biotina. La interacción entre la biotina y la proteína avidina es una de las interacciones no covalente por afinidad más fuerte en la naturaleza ($K_D = 10^{-15} \text{ M}$) [244], y ha sido utilizado en un gran número de aplicaciones, incluyendo inmunoensayos, purificación de proteínas y diagnóstico [245]. La fuerte interacción entre la avidina y la biotina se logra sin perturbaciones significativas de la estructura terciaria o cuaternaria de la proteína y

es estable sobre un amplio intervalo de pH y temperatura [246]. En algunas ocasiones la neutravidina puede usarse en lugar de avidina. Una de las diferencias más marcada entre ellas es que la avidina posee carga positiva a pH neutro, mientras que la neutravidina prácticamente no posee carga.

En este capítulo se presenta la síntesis de un conjugado de LPS con biotina utilizando una fracción purificada de LPS de *Salmonella Minnesota* (sección 3.2). El derivado sintetizado presenta una mejorada actividad endotóxica respecto del conjugado comercial empleado en el dispositivo de reconocimiento molecular previamente descrito [148]. Por otro lado se introduce la síntesis de conjugados de LPS con complejos con buenas propiedades electroactivas.

5.2 – Experimental

5.2.1 – Reactivos

LPS R60 (Ra) de *Salmonella Minnesota* (Mr 4200 Da, actividad endotóxica 0,7 UE ng⁻¹, determinado en nuestro laboratorio mediante el test LAL cromogénico) fue provisto por ListLab. Hidracina de dansilo fue provista por Fluka. Neuraminidasa y galactosa oxidasa (GO) fue provista por Sigma. Las membranas de filtración Ø 25 mm de corte molecular 10000 fueron provistas por Millipore.

5.2.2 – Síntesis de conjugados de LPS con dansilo y biotina

Dado que la región del lípido A constituye la porción pirogénica activa del LPS [2, 9–11] y está involucrada en su reconocimiento específico, un método adecuado para la conjugación del LPS requiere preservar estructural y conformacionalmente esa región de la molécula. Por lo tanto, resulta conveniente que la sonda molecular fuese unida a una región distante como el núcleo polisacárido o, incluso mejor, la región del polisacárido O-específico. Dado que estas regiones están constituidas por hidratos de carbono, un método comúnmente empleado consiste en hacer reaccionar la sonda con los grupos hidroxilos previamente oxidados a aldehídos. Dos métodos fueron evaluados: oxidación enzimática con neuraminidasa y galactosa oxidasa [162] y la oxidación con periodato de sodio [153].

5.2.2.1 – Método enzimático

1,5 mg de LPS purificado (fracción 9-10) o LPS R60, ambos de *Salmonella Minnesota*, se disolvieron en 1 mL de trietilamina 0,05 % p/v. Se agitó intensamente con vórtex durante 3 minutos y luego se sonicó por unos 20 minutos de modo de favorecer su desagregación. Luego se agregaron 8,5 mL de buffer fosfato 100 mM pH 7,0 y de ser necesario se ajustó el pH a 7,0 con HCl 100 mM (Moléculas conteniendo alcoholes primarios sirven como sustrato de la galactosa. Evitar el uso de buffer Tris o HEPES entre otros). La oxidación se llevó a cabo agregando 50 μL de neuraminidasa 1 U mL^{-1} (0,05 nmoles) y 100 μL de galactosa oxidasa 100 U mL^{-1} (1,6 nmoles). La reacción se dejó proseguir durante 20 minutos a 37 °C, con agitación moderada y burbujeo de aire de modo de mantener saturada la solución en oxígeno. La evolución de la oxidación puede seguirse por la generación de peróxido de hidrógeno. Transcurrido el tiempo de oxidación, se adicionaron 250 μL de hidracina de dansilo 2 mg mL^{-1} en buffer fosfato 100 mM pH 7,0 junto con 100 μL de NaCNBH_3 0,3 M, dejando reaccionar durante 6 horas a 37 °C con agitación moderada. El producto final se pasó a través de dos columnas de desalado HiTrap en serie (GE Healthcare de 5 mL de capacidad cada una) empleando buffer fosfato 50 mM pH 7,5 a un flujo de 2 mL min^{-1} .

5.2.2.2 – Oxidación con periodato de sodio

2 mg de LPS purificado (fracción 9-10) de *Salmonella Minnesota* se disolvieron en 4 mL de buffer acético/acetato 100 mM pH 5,0. Se agitó intensamente con vórtex durante 3 minutos y se sonicó por unos 20 minutos. Luego, el NaIO_4 se agregó a diferentes concentraciones de modo de hallar las mejores condiciones de reacción (ver Tabla 5.1 pág. 118). La oxidación se llevó a cabo con agitación moderada en oscuridad durante períodos de tiempo variables según el caso, modificando también la temperatura de reacción. La etapa oxidativa se finalizó mediante el agregado de etilenglicol. El producto luego se dializó contra agua milliQ empleando membranas de corte molecular 3500 a 4 °C durante 24 horas. Sobre el LPS oxidado y dializado se agregaron 2 mg de hidracina de dansilo y 250 μL de NaCNBH_3 450 mM dejando reaccionar durante 2 horas a 25 °C con agitación suave y en oscuridad. Finalmente, el conjugado se purificó por cromatografía de exclusión empleando dos columnas de desalado HiTrap en serie (GE Healthcare de 5 mL de capacidad cada una) empleando buffer fosfato 50 mM pH 7,5 a un flujo de 2 mL min^{-1} . Luego, el conjugado se caracterizó por espectroscopía de

fluorescencia, su contenido de Kdo y su actividad endotóxica según lo descrito en el capítulo 3.

Obtenidas las condiciones más adecuadas para la oxidación de LPS (Tabla 5.1), se procedió a la síntesis del conjugado LPS-biotina. Posterior a la etapa de oxidación se adicionaron 4 mg de biotina-LC-hidracida y se continuó de forma análoga a lo descrito para hidracina de dansilo. El producto purificado cromatográficamente se dializó contra agua MilliQ usando membranas de diálisis de corte molecular 3500 a 4 °C durante 24 horas y luego se liofilizó. El rendimiento de conjugación se determinó por su contenido de Kdo (sección 3.2.2.2) y biotina, mediante el ensayo para su cuantificación, EZ Biotin Quantitation Kit, provisto por Pierce. El test LAL fue empleado para caracterizar la actividad endotóxica del conjugado.

5.2.3 – Síntesis de conjugados de LPS con complejos electroactivos

La síntesis de conjugados de LPS se extendió a la conjugación con complejos electroactivos. El objetivo de esta síntesis fue extender la conjugación a otro tipo de moléculas mostrando la potencialidad del método utilizado. En particular se eligieron dos complejos redox, un complejo de rutenio, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{py}]^{2+}$ y un complejo de osmio, $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{py})\text{Cl}]^{2+}$. Solo en el último caso la síntesis involucra una etapa oxidativa con periodato de sodio.

5.2.3.1 – Síntesis de LPS- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{py}]^{2+}$

2 mg de LPS purificado (fracción 9-10) de *Salmonella Minnesota* se disolvieron en 2 mL de trietilamina 0,5 % v/v. Se agitó intensamente con vórtex durante 3 minutos y se sonicó por unos 20 minutos. Luego, el pH se ajustó a 7 con HCl 100 mM. Sobre la solución de LPS se agregaron 1 mL de isotiocianato de piridina 75 mM en buffer borato 250 mM pH 10,5. La solución se dejó reaccionar durante 18 horas a 37 °C con agitación moderada. Finalmente, la solución se concentró a 1,5 mL empleando una celda de ultrafiltración Amicon Millipore modelo 8010 (10 mL de capacidad) con filtros de corte molecular 10000, reemplazando el buffer de reacción por buffer fosfato 100 mM pH 7,5. El LPS modificado con piridina se purificó por cromatografía de exclusión empleando una columna de desalado HiTrap (GE Healthcare de 5 mL de capacidad) con buffer fosfato 100 mM pH 7,5 como fase móvil a un flujo de 2 mL min⁻¹.

A la solución de LPS-py colectada de la purificación se le adicionaron 500 μL del complejo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{OH}_2]^{2+}$ 15 mM (obtenido por reducción de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{3+}$ con amalgama de zinc-mercurio bajo atmósfera de nitrógeno) en buffer borato 250 mM pH 10,5. En estas condiciones la piridina unida al LPS se coordina con el centro metálico del complejo. La reacción se dejó proseguir bajo atmósfera de nitrógeno por 24 hs a 25 °C con agitación moderada. Finalizada la reacción, se concentró a 1,5 mL reemplazando el buffer de reacción por buffer fosfato 100 mM pH 7,5. El producto de reacción se purificó por cromatografía de exclusión de forma análoga a la anterior descripta. El conjugado purificado cromatográficamente se dializó contra agua MilliQ usando membranas de diálisis de corte molecular 3500 a 4 °C durante 24 horas y luego liofilizado. El rendimiento de conjugación se determinó por su contenido de Kdo (sección 3.2.2.2) y rutenio, por espectrometría de fluorescencia de rayos X por reflexión total (TRXRF). El test LAL se empleó para caracterizar la actividad endotóxica del conjugado.

5.2.3.2 – Síntesis de LPS- $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{py})\text{Cl}]^{2+}$

Se siguió el mismo protocolo descripto para la síntesis de conjugados de LPS con biotina y dansilo, empleando 4-picolinamina como sonda. Las condiciones de oxidación con periodato corresponden a la fila (e) de la Tabla 5.1. El derivado de LPS con picolinamina se purificó por cromatografía de exclusión de la misma forma aplicada para LPS-piridina en la síntesis de LPS con el complejo de rutenio. Finalmente, LPS-picolinamina se hizo reaccionar con 30 mM $\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ en etanol:agua 1:1 durante 24 horas a 37 °C. El conjugado así sintetizado se purificó por cromatografía de exclusión y se caracterizó por su contenido de Kdo (sección 3.2.2.2) y osmio, por espectrofotometría. La actividad endotóxica del conjugado se caracterizó empleando el test LAL.

5.3 – Resultados

5.3.1 – Método enzimático

El LPS purificado se trató con neuraminidasa y galactosa oxidasa como ha sido previamente reportado [162]. El progreso de la reacción se determinó siguiendo la generación de peróxido de hidrógeno con cintas reactivas.

La galactosa oxidasa puede formar grupos aldehídos en el carbono 6 de las galactosas terminales o en residuos de N-acetil-D-galactosa. Cuando los residuos de galactosa están penúltimos a los residuos de ácido siálico, otra enzima, la neuraminidasa, debe ser usada para remover el ácido siálico y exponer a la galactosa como residuo terminal.

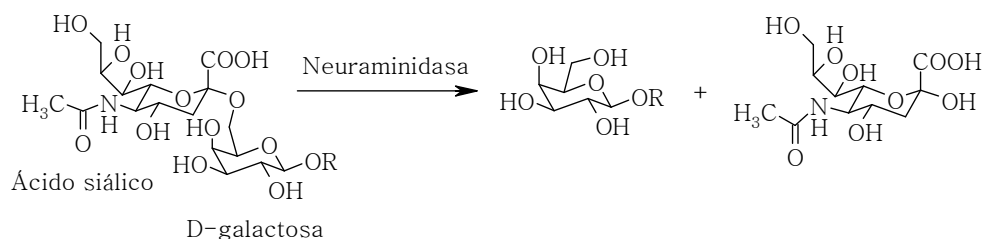


Figura 5.1: Acción enzimática de la neuraminidasa sobre un disacárido de ácido siálico y D-galactosa ejemplificando la situación esperada para LPS.

Por lo tanto, la acción combinada de ambas enzimas genera el respectivo derivado C-6 aldehído de la galactosa que puede conjugarse posteriormente con grupos aminos, hidracinas o hidracidas [243]. El núcleo polisacárido del LPS posee residuos de galactosa y ácido siálico [5]. La galactosa oxidasa cataliza la reacción de alcoholes primarios a aldehídos, de acuerdo con el esquema de la Figura 5.2.

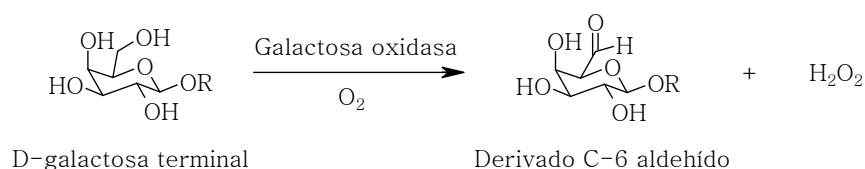


Figura 5.2: Acción enzimática de la galactosa oxidasa sobre la D-galactosa generando un grupo aldehído en el azúcar y liberando peróxido de hidrógeno.

La reacción puede seguirse fácilmente midiendo la producción de peróxido de hidrógeno [247] con tiras reactivas para la detección de peróxido residual (LD = 1 ppm). Para muestras conteniendo LPS y LPS Ra, ambos de *S. Minnesota*, la producción de H_2O_2 resultó por debajo del límite de detección, mientras que para muestras conteniendo la misma concentración de galactosa, una concentración mayor a 10 ppm de peróxido pudo detectarse; esto indica que la galactosa oxidasa no es capaz de acceder a los residuos de galactosa del LPS para su oxidación. Aunque la enzima funciona muy bien sobre monosacáridos, el rendimiento de la reacción fue prácticamente nulo en un

polímero como LPS. Estos resultados pueden comprenderse dado que tanto el LPS como la galactosa oxidasa son moléculas voluminosas, mientras que el LPS, además forma agregados a la concentración empleada.

5.3.2 – Oxidación con periodato de sodio

En este método, el periodato rompe uniones C-C que poseen grupos hidroxilos adyacentes (dioles vecinales), oxidando los grupos -OH para formar aldehídos altamente reactivos (Figura 5.3). Variando la concentración y las condiciones de la reacción durante la oxidación, puede obtenerse cierta especificidad en relación a que y cuantos residuos serán modificados [243]. Al igual que en el método enzimático, los aldehídos así formados, pueden luego ser acoplados a moléculas conteniendo aminas por formación de una base de Schiff y aminación reductiva o alternatively, ser conjugados a moléculas conteniendo el grupo hidracida para formar la unión hidrazona que luego es reducida (Figura 5.3).

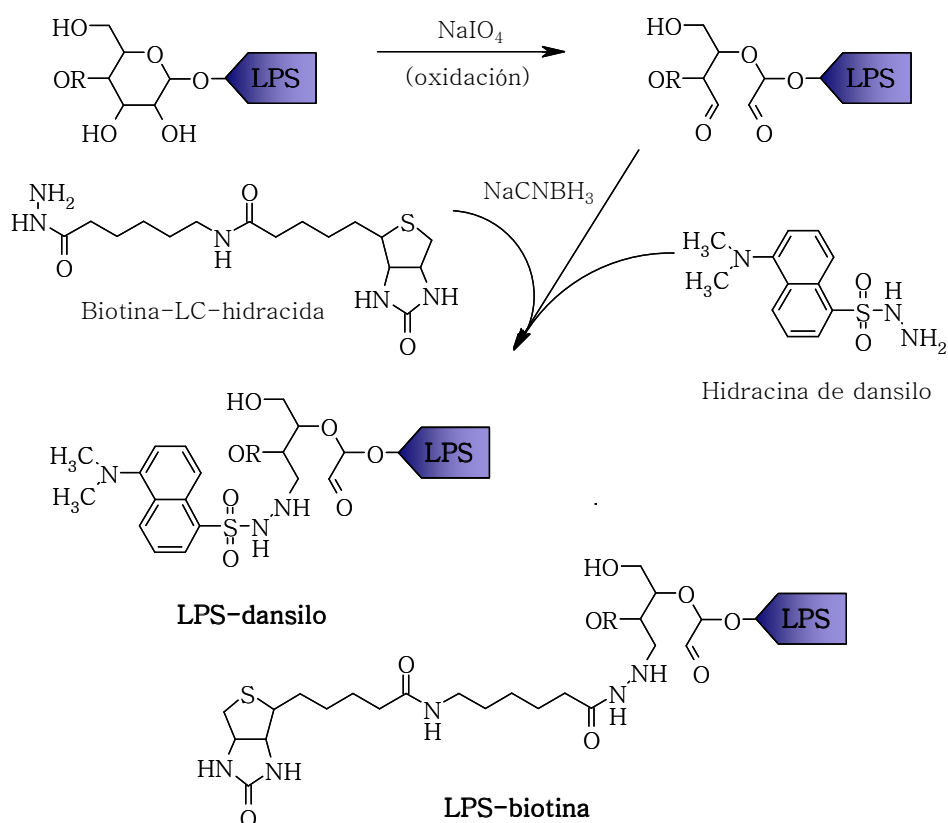


Figura 5.3: Pasos sintéticos involucrados en la modificación de LPS con dansilo y biotina.

Para hallar las mejores condiciones para la conjugación de LPS, se empleó hidracina de dansilo como sonda molecular. Esta molécula permite seguir el rendimiento de la reacción directamente por fluorescencia, siendo muy adecuado en el uso de muestras pequeñas o de baja concentración. La hidracina de dansilo se hizo reaccionar con LPS purificado cambiando la concentración de periodato, el tiempo de reacción y la temperatura. Finalizada la reacción, el conjugado se purificó por cromatografía de exclusión. La Figura 5.4 muestra el cromatograma obtenido para la purificación de LPS-dansilo según las condiciones de la fila (d) de la Tabla 5.1. Dadas las características de la columna, el derivado de LPS, de alta masa molecular, interacciona poco con la misma eluyendo primero. El segundo pico corresponde al exceso de dansilo que no reaccionó con el lipopolisacárido. La fracción correspondiente al derivado endotóxico fue colectada, dializada y caracterizada. El rendimiento de conjugación se determinó de acuerdo a la sección 3.5. El contenido de dansilo en el conjugado se evaluó por fluorescencia, excitando con luz de 325 nm y midiendo la emisión entre 350 y 750 nm según lo descrito en la sección 3.5.1. Para comparar la reactividad de la porción sacárida presente en el LPS con otros polisacáridos, se eligió como referencia un dextrano de masa molecular 66880 Da. Finalmente, la reacción de derivatización de una fracción de LPS purificado (actividad endotóxica $0,4 \text{ UE ng}^{-1}$) se llevó a cabo con biotina-LC-hidracida. Sólo se utilizó una fracción de LPS, de manera de tener un rango acotado de masa molecular.

Conjugado	Condiciones de oxidación			Conjugación ^a
	NaIO ₄ (mM)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	
a Dextrán-dansilo	1	0	10	145
b LPS-dansilo	7	0	14	0
c LPS-dansilo	7	20	24	40
d LPS-dansilo	150	45	16	150
e LPS-biotina	150	20	3	50

^a nmoles de sonda/mg de polímero

Tabla 5.1: Condiciones de oxidación de carbohidratos presentes en el LPS o dextrano y relaciones de conjugación.

La Tabla 5.1 muestra las relaciones de conjugación obtenidas para diferentes condiciones de reacción. Como referencia, se presenta un experimento llevado a cabo con dextrano (Mr 66880 Da). La oxidación de dextrano con periodato procede con buen rendimiento, incluso en condiciones suaves, con una relación de conjugación de 145 nmoles de dansilo por mg de polímero, equivalente a 10 moléculas de dansilo por

molécula de dextrano (fila a). Cuando se utiliza el LPS para su conjugación, bajo condiciones similares (fila b) e incluso en condiciones más agresivas (fila c), se obtuvieron relaciones de conjugación menores. Estos resultados pueden explicarse considerando el diferente comportamiento de cada molécula en solución acuosa. El LPS forma agregados de alta masa molecular a las concentraciones empleadas en estas reacciones. La relación de conjugación puede mejorarse si las condiciones de oxidación son más severas; sin embargo, esto da lugar a una pérdida casi completa de la actividad endotóxica del LPS (fila d).

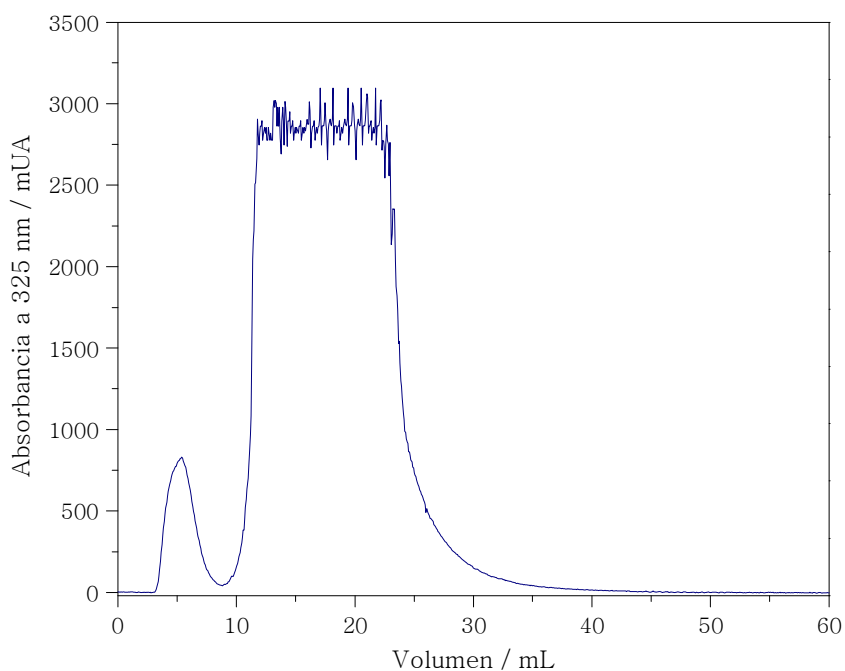


Figura 5.4: Purificación cromatográfica del conjugado LPS-dansilo correspondiente a las condiciones de la fila d de la Tabla 5.1. Se inyectaron 3 mL de la solución de reacción.

Finalmente, se sintetizó un conjugado de LPS-biotina en las condiciones detalladas en la Tabla 5.1 (fila e), permitiendo la introducción de un cierto número de sondas, reteniendo en el LPS una actividad endotóxica de $0,08 \text{ UE ng}^{-1}$. La caracterización muestra una derivatización de 50 nmoles de biotina por mg de LPS, correspondiente a una relación biotina:LPS igual a 1:1 considerando una masa molecular promedio de 20 kDa para el LPS [22, 31].

Un procedimiento similar fue aplicado en la modificación de LPS con un complejo de osmio según lo descrito en la sección 5.2.3.2. Posterior a la oxidación con periodato de sodio, se hizo reaccionar la endotoxina con 4-picolinamina (Figura 5.5). De

esta forma se introducen al LPS moléculas de piridina que luego pueden hacerse reaccionar con el complejo $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]^{2+}$. La reacción de 4-picolinamina con el LPS se evidencia por el primer pico de elución en el perfil cromatográfico monitoreando la longitud de onda a 260 nm (Figura 5.6 A). Luego, la piridina en el LPS desplaza a uno de los ligandos cloruro en el complejo, resultando en su coordinación con el centro metálico. La conjugación del complejo de osmio al lipopolisacárido resulta en un derivado de alta masa molecular que eluye prácticamente sin interaccionar con la columna de exclusión (Figura 5.6 B).

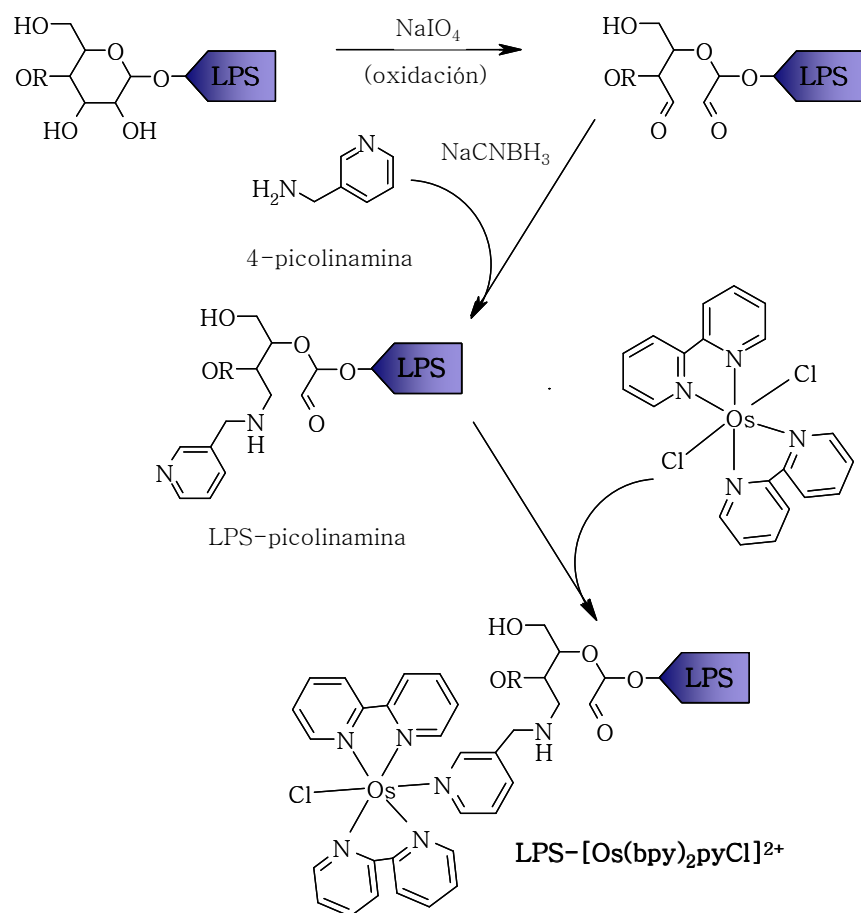


Figura 5.5: Síntesis de LPS-picolinamina y posterior conjugación con $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]^{2+}$ a través del desplazamiento de uno de los ligandos cloruro del complejo por la piridina en el LPS.

Finalmente, el conjugado se caracterizó por su contenido de Kdo y por espectrofotometría ($[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{py})\text{Cl}]^{2+}$ $\epsilon_{500\text{nm}} = 8700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [128]) para hallar la concentración del complejo de osmio. En estas condiciones pudieron introducirse 40 nmoles del complejo por mg de LPS, relación similar a la obtenida para LPS-biotina. Debe tenerse en cuenta, en este caso, que la relación de conjugación está afectada por

el rendimiento de conjugación de las dos reacciones involucradas, la incorporación de la picolina y la posterior complejación. Este hecho también se vio reflejado en la actividad endotóxica del derivado, rindiendo una potencia pirógena de $0,05 \text{ UE ng}^{-1}$, cifra 40 % inferior a la correspondiente para LPS-biotina.

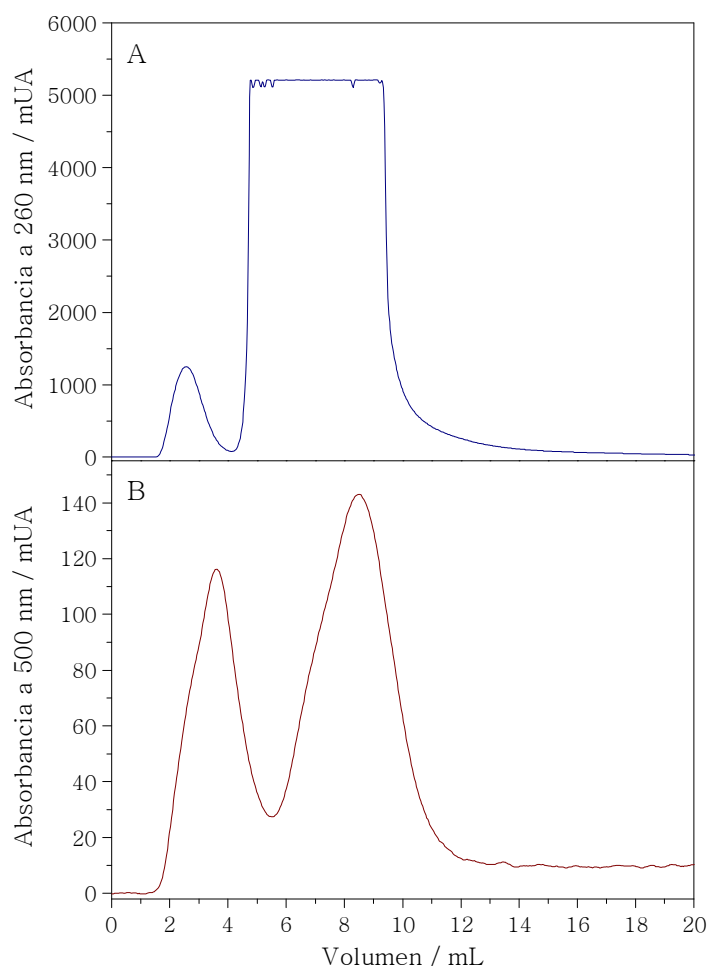


Figura 5.6: Purificación por cromatografía de exclusión de A) derivado LPS-picolinamina, B) derivado LPS- $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{py})\text{Cl}]^{2+}$. En ambos casos el volumen de inyección fue de 1 mL.

5.3.3 – Síntesis de LPS- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{py}]^{2+}$

En la síntesis del conjugado de LPS con un complejo electroactivo de rutenio, la estrategia empleada es similar a la descrita para el derivado de LPS- $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{py})\text{Cl}]^{2+}$. En primera instancia, se introduce al lipopolisacárido una piridina que luego puede hacerse reaccionar con un complejo de rutenio para dar lugar al conjugado deseado. En este caso, la incorporación de la piridina al LPS se realiza en

forma directa haciendo reaccionar isotiocianato de piridina (Figura 5.7) con los hidroxilos de la endotoxina.

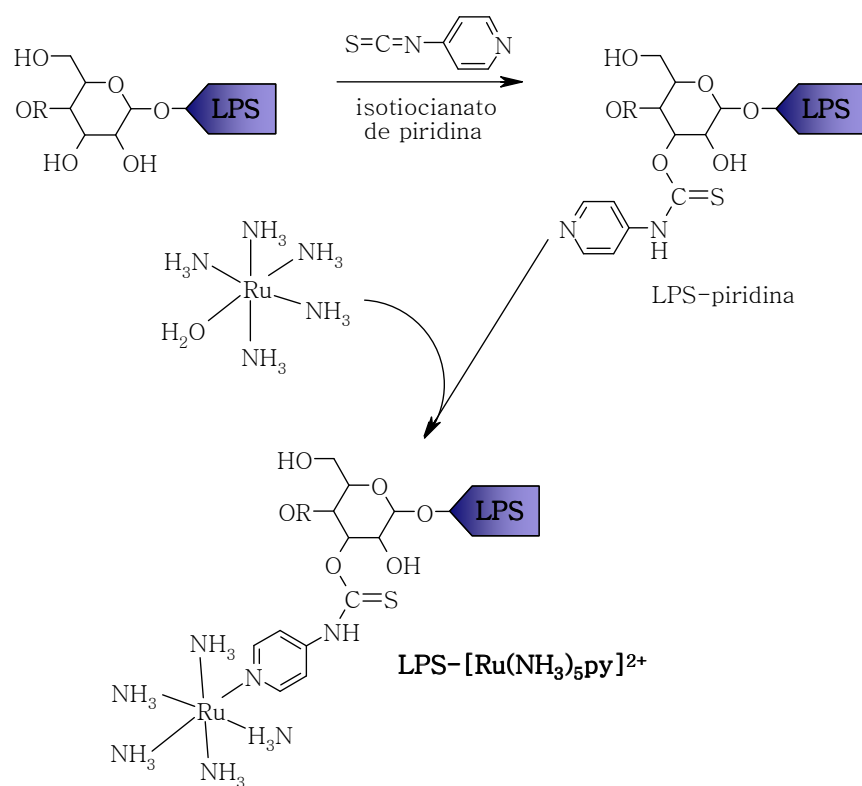


Figura 5.7: Síntesis de LPS-piridina y posterior conjugación con $[Ru(NH_3)_5OH_2]^{2+}$ a través del desplazamiento del ligando $-OH_2$ del complejo por la piridina en el LPS. El cambio de ligando se caracteriza por la aparición de una banda de transferencia de carga metal-ligando a 407 nm.

La incorporación de la piridina se evidencia durante la etapa de purificación cromatográfica del derivado midiendo la absorbancia a 260 nm (Figura 5.8 A). Luego, la adición de $[Ru(NH_3)_5OH_2]^{2+}$ a la fracción correspondiente al primer pico de elución propicia la formación del derivado de LPS con el complejo de rutenio. Similarmente al caso del complejo de osmio, el ligando $-OH_2$ es desplazado por la piridina en el LPS estableciéndose la unión del complejo de rutenio al lipopolisacárido. Al darse esta reacción puede observarse a 407 nm la banda correspondiente a la transferencia de carga desde un orbital d del centro metálico Ru(II) al orbital π antienlazante de la piridina [248]. En el cromatograma B de la Figura 5.8 puede observarse un primer pico de elución, que corresponde a una molécula de alta masa molecular, que presenta absorción tanto a 260 como a 407 nm. El segundo pico, sin embargo, solo presenta absorción significativa a 260 nm. Estas observaciones se corresponden con la obtención del $LPS-[Ru(NH_3)_5py]^{2+}$, que eluye primero en la columna de exclusión. El segundo

pico corresponde al exceso de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{OH}_2]^{2+}$ que no ha reaccionado con la piridina unida al LPS.

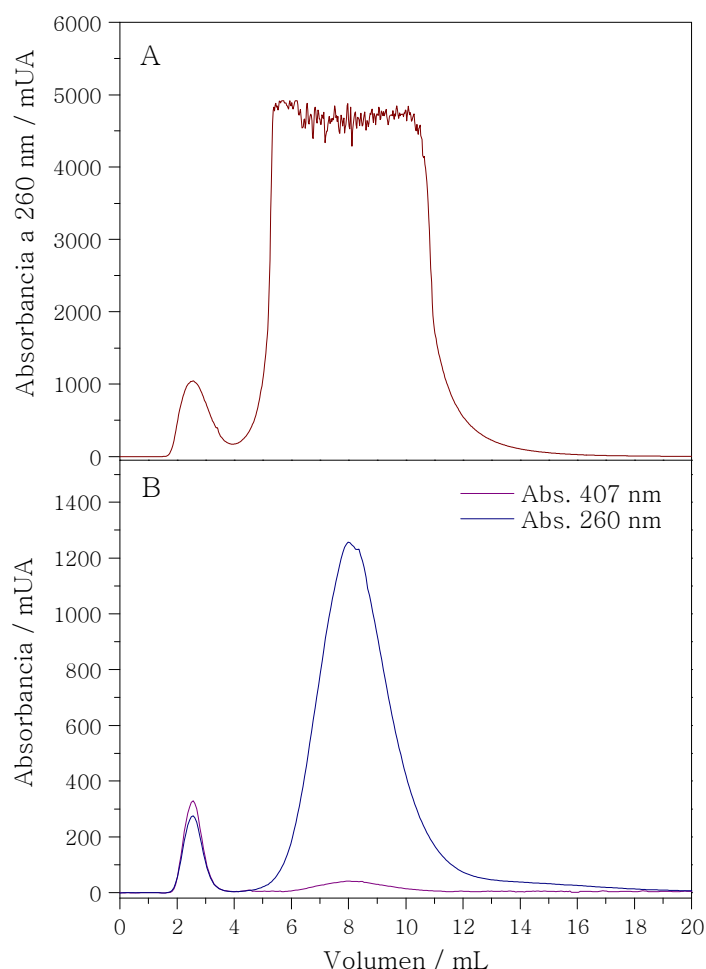


Figura 5.6: Purificación por cromatografía de exclusión de A) derivado LPS-piridina, B) derivado LPS- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{py}]^{2+}$ monitoreado a dos longitudes de onda, 407 y 260 nm. En ambos casos el volumen de inyección fue de 1 mL.

Una vez purificado y liofilizado, el conjugado obtenido se caracterizó por su contenido de Kdo y por espectrometría de fluorescencia de rayos X por reflexión total (TRXRF) para hallar la concentración de rutenio. Los resultados obtenidos están asociados con la incorporación de 140 nmoles del complejo de rutenio por mg de LPS. Este valor es significativamente superior al obtenido para el complejo de osmio y similar al obtenido para LPS con dansilo en las condiciones más severas (Tabla 5.1 fila d). La mejora que se obtiene en este procedimiento sintético podemos atribuirlo al proceso más favorable de sustitución de ligando que se da en el caso del complejo de rutenio respecto del complejo de osmio. En este último las condiciones óptimas para

desplazar un ligando cloruro por la piridina involucran temperaturas más elevadas [249], en contraposición a lo que sucede con el complejo de rutenio. La elección de condiciones más suaves en el procedimiento sintético del osmio tiene su justificación en la intención de preservar la actividad endotóxica del LPS.

La estrategia sintética para obtener un derivado de LPS con un complejo de rutenio no involucra el tratamiento con periodato de sodio. Este hecho se refleja en una mayor conservación de la actividad pirógena del lipopolisacárido, rindiendo una potencia endotóxica de $0,15 \text{ UE ng}^{-1}$, casi dos veces superior a la actividad del conjugado LPS-biotina.

5.4 – Sumario

El procedimiento enzimático empleado con la intención de generar grupos aldehídos en la estructura del LPS no dio resultados positivos. Si bien se comprobó la correcta actividad de la galactosa oxidasa sobre monosacáridos, su acción sobre un polímero como el LPS fue nula. Pueden comprenderse estos resultados teniendo en mente que tanto el LPS como la galactosa oxidasa son moléculas voluminosas, lo cual dificulta el acceso de la enzima a los residuos de galactosa. Este hecho se ve intensificado dada la facilidad del LPS de formar agregados de alta masa molecular.

La otra estrategia sintética empleada involucró la oxidación del LPS con periodato de sodio dando lugar a la formación de grupos aldehídos, que luego reaccionan con los grupos hidracina o hidracida de la sonda a conjugar. La hidrazona obtenida posteriormente se reduce obteniéndose el conjugado deseado. El rendimiento de conjugación depende fuertemente de la concentración de periodato de sodio, el tiempo y la temperatura empleada durante la etapa de oxidación. Dada la inercia química del LPS y su tendencia a agregarse, para su modificación, las condiciones de oxidación debieron ser más intensas que las usualmente empleadas con carbohidratos de cadena larga. La conjugación de la sonda al LPS se favorece con el aumento de cada uno de los parámetros mencionados. Sin embargo, la actividad endotóxica del LPS tiene una dependencia inversa evidenciando una disminución drástica con el aumento del rendimiento de conjugación. Por lo tanto, las condiciones de reacción deben ser las adecuadas de modo de obtener una eficiente conjugación conservando la actividad endotóxica.

Una fracción purificada de LPS de *S. Minnesota* se modificó con biotina. El conjugado muestra una adecuada actividad endotóxica y un buen nivel de conjugación.

Las buenas propiedades de este conjugado permitieron su utilización en un ensayo competitivo donde la presencia del LPS-biotina en la superficie del electrodo se revelaba con otro conjugado, N-HRP. Los detalles de este trabajo fueron presentados en la tesis de la Dra. Priano [122] y publicados en [164]. En el capítulo 9 se discutirán algunas características de este sistema y se compararán con los resultados obtenidos para otro tipo de ensayo competitivo realizado en este trabajo de tesis y descrito en el capítulo 8. Comparado con trabajos previos [153, 242], para obtener tal nivel de modificación fue necesario emplear concentraciones más elevadas de periodato con tiempos de reacción más prolongados. El conjugado así obtenido presenta una actividad endotóxica ocho veces mayor respecto al empleado previamente en un ensayo competitivo [148]. Por esta misma vía sintética se sintetizó un derivado de LPS con un complejo de osmio con estequiometría y potencia endotóxica similar a la del derivado con biotina. En este caso, el tratamiento con periodato da lugar a la formación de grupos aldehídos en el LPS, que luego reaccionan con 4-picolinamina y finalmente es la piridina la que coordina con el centro metálico para dar lugar al conjugado deseado.

Una estrategia diferente se empleó en el caso de la conjugación con un complejo de rutenio. Aquí la incorporación de la piridina al LPS se llevó a cabo por reacción directa con isotiocianato de piridina evitando el procedimiento oxidativo con periodato. El derivado obtenido evidenció una potencia endotóxica y un rendimiento de conjugación significativamente superior al análogo con osmio demostrando la eficiencia de la síntesis propuesta.

Capítulo **6**

Conjugados de LPS:
Activación con BrCN



6.1 – Introducción

Los grupos funcionales amino primario, hidracina e hidracida están presentes en una miríada de sondas fluorescentes y moléculas espaciadoras. Por otra parte, los grupos aminos primarios están presentes naturalmente en las proteínas a través de los residuos de lisina; en consecuencia desarrollar un método que involucre la conjugación de los LPS con moléculas portadoras de estos grupos funcionales (hidracina, hidracida y amino) le otorgará al LPS la posibilidad de ser marcado con una gran diversidad de sondas.

Dado que una de las características del LPS es la formación de agregados, se centró la atención en reacciones que se llevan a cabo sobre hidratos de carbono insolubles, tal como la activación de agarosa para la construcción de rellenos para columnas de afinidad. Uno de los métodos más eficientes para lograr esto es la activación mediante el uso de bromuro de cianógeno (BrCN) [250, 251]. La activación se da sobre los grupos hidroxilo del carbohidrato generando un éster cianato reactivo (Figura 6.1). Es importante controlar las condiciones bajo las cuales estas reacciones se llevan a cabo, dado que los éster cianato pueden hidrolizarse a carbamatos inertes. Por ejemplo, el uso de hidróxido de sodio para aumentar la nucleofilicidad de los grupos hidroxilo puede dar lugar a la formación de carbamatos inertes. El control de la temperatura es otro de los factores importantes a controlar en el proceso de activación, dado que la molécula activada es muy sensible a este parámetro. Para superar estos dos problemas, se emplea trietilamina como agente de transferencia de cianuro en una mezcla acetona:agua a temperaturas por debajo de 0 °C, evitando de esta forma la necesidad de un medio fuertemente alcalino [252, 253].

En este capítulo se presenta la síntesis de conjugados de LPS liso con sondas conteniendo grupos hidracina o amino primario, a través de la activación con BrCN de los grupos hidroxilo presentes en el antígeno O. La modificación de LPS con BrCN es un proceso que involucra dos pasos (Figura 6.1). El primer paso consiste en la activación de los grupos hidroxilo introduciendo un éster cianato; el segundo corresponde a la unión covalente de la sonda seleccionada a la molécula activada.

Como sistema modelo, se ha llevado a cabo la conjugación de LPS liso de *Salmonella Minnesota* con hidracina de dansilo y peroxidasa de rábano picante. Empleando esta metodología se han obtenido relaciones de conjugación de 330 nmoles de dansilo por mg de LPS, preservando la actividad endotóxica. En el caso de la peroxidasa, previa modificación con una molécula espaciadora, pudo obtenerse una

relación de conjugación de 28 nmoles de enzima por mg de LPS, conservando un 65 % de la actividad endotóxica original.

6.2 – Experimental

6.2.1 – Reactivos

El ácido sinapínico fue provisto por Fluka; peroxidasa de rábano picante isoenzima C (HRP C) fue provista por Biozyme. Trietilamina (TEA) y bromuro de cianógeno (BrCN) fueron provistos por Sigma *(Nota: El bromuro de cianógeno puede resultar fatal si se lo ingiere, inhala o se absorbe a través de la piel. Sus vapores pueden causar irritación severa a los ojos y al tracto respiratorio. Causa quemaduras sobre cualquier zona de contacto. En contacto con ácidos libera gases tóxicos. Afecta el sistema cardiovascular, el sistema nervioso central y tiroides. Debe emplearse para su manipuleo, guardapolvo, guantes y anteojos de seguridad)*. FMOC-PEG-COOH (Figura 6.7 A) fue provisto por Novabiochem. Las membranas de diálisis de celulosa regenerada (RC Spectra/Por) de corte molecular 12000 se obtuvieron de Spectrum® Laboratories. Las membranas de filtración Ø 25 mm de corte molecular 30000 fueron provistas por Millipore.

6.2.2 – Síntesis del conjugado LPS-dansilo

La fracción 9-10 del LPS purificado fue utilizada para realizar la conjugación. 3 mg de LPS de *S. Minnesota* fueron disueltos en 4 mL de acetona al 60 % v/v en agua; la solución fue refrigerada a -15 °C en una baño de etanol-agua. A la solución de LPS, bajo agitación constante, se le adicionaron 50 µL de BrCN 1 M. Inmediatamente, se agregó gota a gota durante el período de 3 minutos 400 µL de una solución de trietilamina 0,15 M (Figura 6.1). Todas las soluciones se prepararon en acetona. Se dejó reaccionar por el período de 5 minutos y luego, se agregaron 200 µL de una solución 4 mg mL⁻¹ de hidracina de dansilo en DMSO. La mezcla de reacción resultante se mantuvo bajo agitación durante 2 horas a 4 °C en oscuridad. Finalmente, se detuvo la reacción mediante la adición de 1 mL de solución de etanolamina 1 M dejando reaccionar por 30 minutos.

El dansilo que no reaccionó se removió haciendo pasar la solución por dos columnas de desalado HiTrap en serie (GE Healthcare de 5 mL de capacidad cada una)

empleando como buffer de elución fosfato 15 mM pH 7,5 conteniendo NaCl 15 mM a un flujo de 2 mL min⁻¹. Luego, el conjugado se dializó contra agua MilliQ usando tubos de corte molecular 3500 a 4 °C durante 24 horas en oscuridad. El producto resultante se liofilizó y caracterizó por espectroscopía de fluorescencia (sección 3.5.1), espectroscopía de absorción molecular, su contenido de Kdo (sección 3.2.2.2) y su actividad endotóxica (sección 3.2.2.2).

6.2.3 – Síntesis del conjugado LPS-HRP

En forma análoga a lo descripto en la síntesis del conjugado de LPS con dansilo se procedió a la modificación de LPS con HRP. La misma fracción de LPS purificado se utilizó para realizar la conjugación. 3 mg de LPS de *S. Minnesota* se disolvieron en 4 mL de acetona al 60 % v/v en agua; la solución fue refrigerada a -15 °C en una baño de etanol-agua. A la solución de LPS, bajo agitación constante, se le adicionaron 50 µL de BrCN 1 M. Inmediatamente, se agregó gota a gota durante el período de 3 minutos 400 µL de una solución de trietilamina 0,15 M (Figura 6.5). Todas las soluciones se prepararon en acetona. Se dejó reaccionar por el período de 5 minutos y luego, se agregaron 1,5 mL de solución de HRP 10 mg mL⁻¹ en agua MilliQ. La mezcla de reacción resultante se mantuvo bajo agitación durante 2 horas a 4 °C en oscuridad. Finalmente, se detuvo la reacción mediante la adición de 1 mL de solución de etanolamina 1 M dejando reaccionar por 30 minutos.

Finalizada la reacción, la solución se concentró a 3 mL empleando una celda de ultrafiltración Amicon Millipore modelo 8010 (10 mL de capacidad) con filtros de corte molecular 30000. El concentrado se pasó a través de dos columnas de desalado HiTrap en serie (GE Healthcare de 5 mL de capacidad cada una) empleando como buffer de elución Tris 50 mM pH 6,5. Finalmente, la enzima que no reaccionó se separó mediante la purificación cromatográfica del conjugado empleando una columna de intercambio aniónico, en escala analítica, ANX FF (high sub) (GE Healthcare de 1 mL de capacidad). 100 µL de la fracción de conjugado, proveniente del desalado cromatográfico (aproximadamente 300 µg), se inyectaron en la columna. Los buffers de unión y elución empleados fueron, Tris 50 mM pH 6,5 y Tris 50 mM pH 6,5 conteniendo NaCl 1 M, respectivamente. La separación cromatográfica se realizó a un flujo de 1,0 mL min⁻¹. El buffer de unión se aplicó durante 8 volúmenes de columna (VC). La elución del conjugado se alcanzó con el buffer de elución empleando un gradiente de 0 a 100 % durante 3 VC, manteniendo el 100 % durante 8 VC de forma de asegurarse la completa

elución del analito. La corrida cromatográfica se monitoreó registrando la absorbancia a 403 nm. La fracción correspondiente al conjugado LPS-HRP, que eluye luego de aplicar un aumento de la fuerza iónica, se dializó posteriormente contra agua MilliQ usando tubos de corte molecular 12000 a 4 °C durante 24 horas en oscuridad. El producto resultante se liofilizó y caracterizó por su contenido de HRP (sección 3.5.4) y Kdo (sección 3.2.2.2).

6.2.4 – Modificación de HRP con FMOC-PEG-COOH

Todos los reactivos se disolvieron en acetonitrilo anhidro (destilado en presencia de CaCl_2 bajo atmósfera de argón recogiendo el destilado en tamices moleculares 3A, Aldrich). A 6 mg de FMOC-PEG-COOH (Figura 6.7 A) disueltos en 5 mL, se le agregaron bajo atmósfera de argón, 1,2 mL de NHS 2 mg mL^{-1} y 2 mL de EDC 5 mg mL^{-1} . Se dejó reaccionar durante 1 hora con agitación y flujo constante de argón. Luego se agregaron 5 mL de HRP 10 mg mL^{-1} y 0,25 mL de trietilamina 0,3 M permitiendo transcurrir la reacción por 90 minutos con agitación (Figura 6.7 A). Luego, el acetonitrilo se removió por destilación al vacío a 25 °C. El producto seco se disolvió en agua MilliQ y purificó empleando dos columnas de desalado HiTrap en serie (GE Healthcare de 5 mL de capacidad cada una) empleando como buffer de elución fosfato 15 mM pH 7,5 conteniendo NaCl 15 mM a un flujo de 2 mL min^{-1} . La fracción correspondiente a la enzima modificada se dializó contra agua MilliQ empleando tubos de corte molecular 12000 a 4 °C durante 24 horas en oscuridad y luego se liofilizó.

La modificación de la enzima se comprobó por la aparición de una banda aguda a aproximadamente 300 nm, correspondiente al grupo FMOC. También pudo comprobarse la incorporación del polietilenglicol protegido por el cambio en la masa molecular por espectrometría MALDI-TOF según lo descrito en la sección 3.5.2.

Para remover el grupo protector FMOC, el sólido disuelto en una solución de piperidina al 20% v/v en DMF se dejó reaccionar durante 20 minutos a temperatura ambiente. La remoción del FMOC fue seguida por cromatografía en placa delgada utilizando cromatofolios de sílica gel F₂₅₄ de 0,20 mm de espesor, sobre soporte de aluminio y por espectrometría MALDI-TOF.

6.2.5 – Conjugación de LPS con PEG-HRP

3 mg de la fracción 9-10 de LPS de *S. Minnesota* se disolvieron en 4 mL de acetona al 60 % v/v en agua; la solución se refrigeró a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un baño de etanol-agua. A la solución de LPS, bajo agitación constante, se le adicionaron 50 μL de BrCN 1 M. Inmediatamente, se agregó gota a gota durante el período de 3 minutos 400 μL de una solución de trietilamina 0,15 M (Figura 6.7 B). Todas las soluciones se prepararon en acetona. Se dejó reaccionar por el período de 5 minutos y luego, se agregaron 1,5 mL de solución de PEG-HRP 10 mg mL^{-1} proveniente del paso de desprotección. La solución se mantuvo bajo agitación durante 2 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad. La reacción se detuvo por agregado de 1 mL de solución de etanolamina 1 M dejando reaccionar por 30 minutos.

Finalizada la reacción, la solución se concentró a 3 mL empleando una celda de ultrafiltración Amicon Millipore modelo 8010 (10 mL de capacidad) con filtros de corte molecular 30000. El concentrado se pasó luego a través de dos columnas de desalado HiTrap en serie (GE Healthcare de 5 mL de capacidad cada una) a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, empleando como buffer de elución Tris 50 mM pH 6,5. Finalmente, la enzima que no reaccionó se separó mediante la purificación cromatográfica del conjugado empleando una columna de intercambio aniónico.

6.2.5.1 – Purificación cromatográfica del conjugado LPS-PEG-HRP

La separación cromatográfica de la enzima que no reaccionó se realizó en una columna de intercambio aniónico, en escala analítica, ANX FF (high sub) (GE Healthcare de 1 mL de capacidad). 100 μL de la fracción de conjugado, proveniente del desalado cromatográfico (aproximadamente 300 μg), se inyectaron en la columna. Los buffers de unión y elución empleados fueron, Tris 50 mM pH 6,5 y Tris 50 mM pH 6,5 conteniendo NaCl 1 M, respectivamente. La separación cromatográfica se realizó a un flujo de $1,0\text{ mL min}^{-1}$. El buffer de unión se aplicó durante 6 VC. La elución del conjugado se alcanzó con el buffer de elución empleando un gradiente de 0 a 100 % durante 6 VC, manteniendo el 100 % durante 8 VC de forma de asegurarse la completa elución del analito. La corrida cromatográfica se monitoreó registrando la absorbancia a 403 nm.

Una purificación a mayor escala se realizó en una columna ANX FF (high sub) (GE Healthcare de 20 mL de capacidad). El volumen de inyección se escaló a 3 mL. El flujo se incrementó a 4 mL min^{-1} . El buffer de unión se aplicó durante 6 VC y el buffer

de elución fue de 0 a 100 % en 3 VC. Todos los experimentos se realizaron a 25 °C. Las fracciones correspondientes al conjugado purificados se juntaron y se concentraron a 4mL empleando una celda de ultrafiltración Amicon Millipore modelo 8010 (10 mL de capacidad) con filtros de corte molecular 30000. Luego, el concentrado se dializó contra agua MilliQ empleando tubos de corte molecular 12000 a 4 °C durante 24 horas en oscuridad y se liofilizó.

El sólido resultante se caracterizó por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (sección 3.2.2.3), por su contenido de HRP (sección 3.5.4), su contenido de Kdo (sección 3.2.2.2), actividad enzimática (sección 3.5.3) y actividad endotóxica (sección 3.2.2.2).

6.3 – Resultados

6.3.1 – Conjugado LPS-dansilo

Una fracción purificada de LPS se empleó para su conjugación con hidracina de dansilo, luego de su previa activación con bromuro de cianógeno. El LPS se disolvió en solución de acetona acuosa 60 % v/v y refrigeró a -15 °C, en esas condiciones se activaron los grupos hidroxilos del LPS con BrCN. Luego, la adición de una solución de hidracina de dansilo en DMSO permitió completar la conjugación (Figura 6.1).

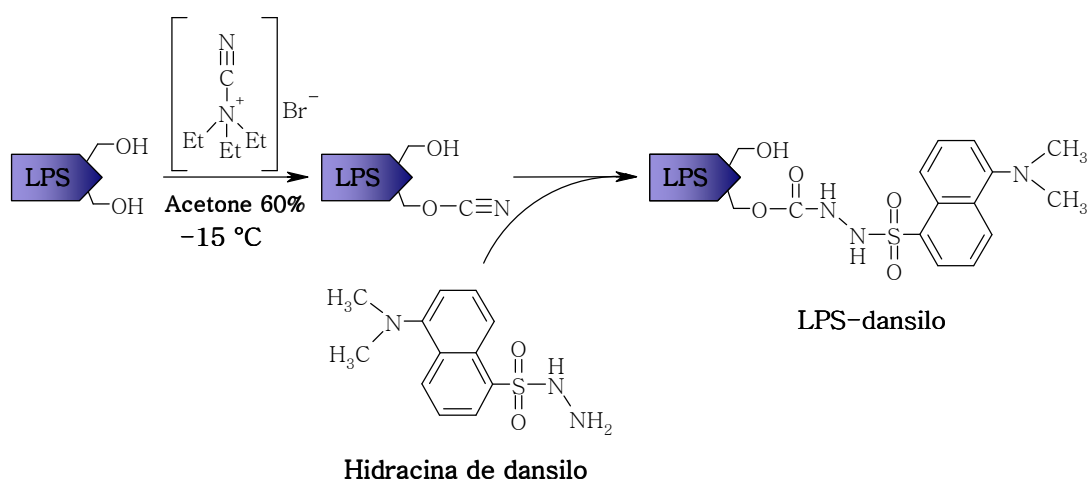


Figura 6.1: Pasos sintéticos involucrados en la conjugación de LPS con hidracina de dansilo.

Finalizada la reacción, la mezcla de reactivos y productos se pasó a través de una serie de columnas de desalado de modo de separar el fluoróforo que no había

reaccionado (segundo pico) del conjugado LPS-dansilo (primer pico) (Figura 6.2). Finalmente, el conjugado fue dializado y liofilizado. El sólido resultante presentaba una coloración verde pálido debido a la presencia del dansilo.

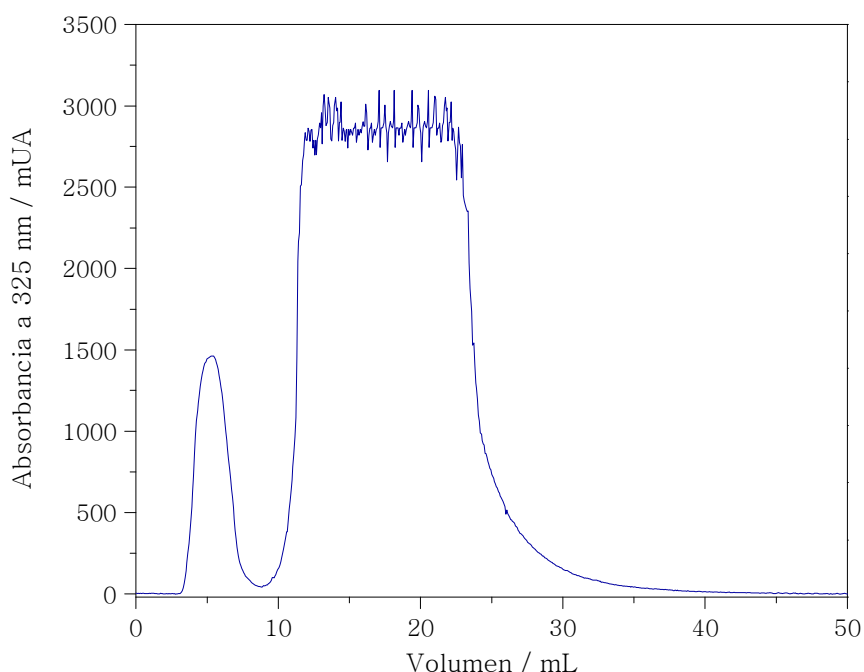


Figura 6.2: Purificación cromatográfica del conjugado LPS-dansilo. Se inyectaron 3 mL de la solución de reacción. El seguimiento se realizó a través de la banda de absorción de dansilo a 325 nm.

El conjugado LPS-dansilo se caracterizó por espectroscopía de fluorescencia y espectroscopía de absorción molecular. Los espectros de absorción de, ambos, el conjugado y el dansilo libre son similares (Figura 6.3); sin embargo, en el espectro de fluorescencia, la longitud de onda del máximo de emisión del dansilo libre permanece constante con el aumento de la concentración (Figura 6.4), mientras que en el caso del conjugado, la longitud de onda del máximo de emisión se desplaza de 495 nm a 502 nm. También, en este último caso, la intensidad de fluorescencia no aumenta proporcionalmente con el aumento de la concentración (Figura insertada), debido a la agregación del LPS [21, 33].

A concentraciones por debajo de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, ambos, el conjugado de dansilo y el dansilo libre tienen un comportamiento similar, presentando una intensidad de emisión que escala linealmente con el incremento de la concentración. En este intervalo de concentraciones no se observa ningún cambio en la longitud de onda del máximo de emisión. Estas observaciones son consistentes con el valor de la concentración micelar

crítica (CMC) para LPS de *Salmonella Minnesota*, cuyo valor ha sido reportado como $11 \mu\text{g mL}^{-1}$ [31].

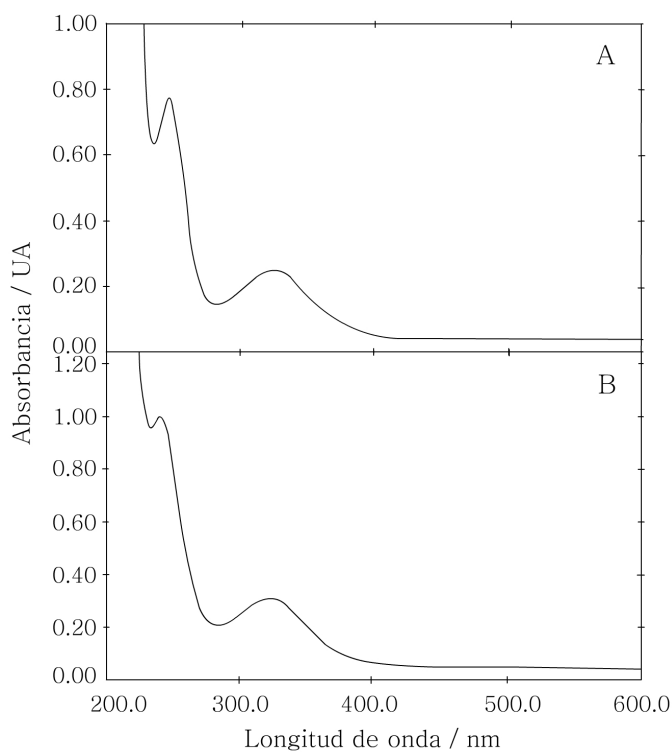


Figura 6.3: Espectros de absorción en agua MilliQ de A) hidracina de dansilo $45 \mu\text{M}$ y B) LPS-dansilo $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Empleando la información que se obtiene del espectro de emisión del conjugado a una concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, pudo calcularse la relación de concentración entre el dansilo y el LPS, resultando en la incorporación de 330 nmoles de fluoróforo por mg de LPS. La actividad endotóxica de este nuevo conjugado de dansilo es de $1,5 \text{ UE ng}^{-1}$, que representa la conservación del 90 % de la actividad pirógena original de la fracción de LPS utilizada en esta síntesis ($1,7 \text{ UE ng}^{-1}$). Este resultado es marcadamente superior al obtenido en la síntesis de LPS con biotina reportado en el capítulo 5, donde la actividad pirógena del conjugado disminuye a un 10 % de la actividad endotóxica del LPS de partida, presentando además una relación de conjugación 6 veces inferior.

En comparación con un conjugado comercial LPS-HRP adquirido de AlerCHEK Inc. la diferencia es notable. Este derivado de LPS presentaba una actividad endotóxica de apenas $0,012 \text{ UE ng}^{-1}$, lo cual afectaba la sensibilidad de un ensayo competitivo desarrollado en nuestro grupo [148]. Esta estrategia representa un avance importante en la química de conjugación de lipopolisacáridos.

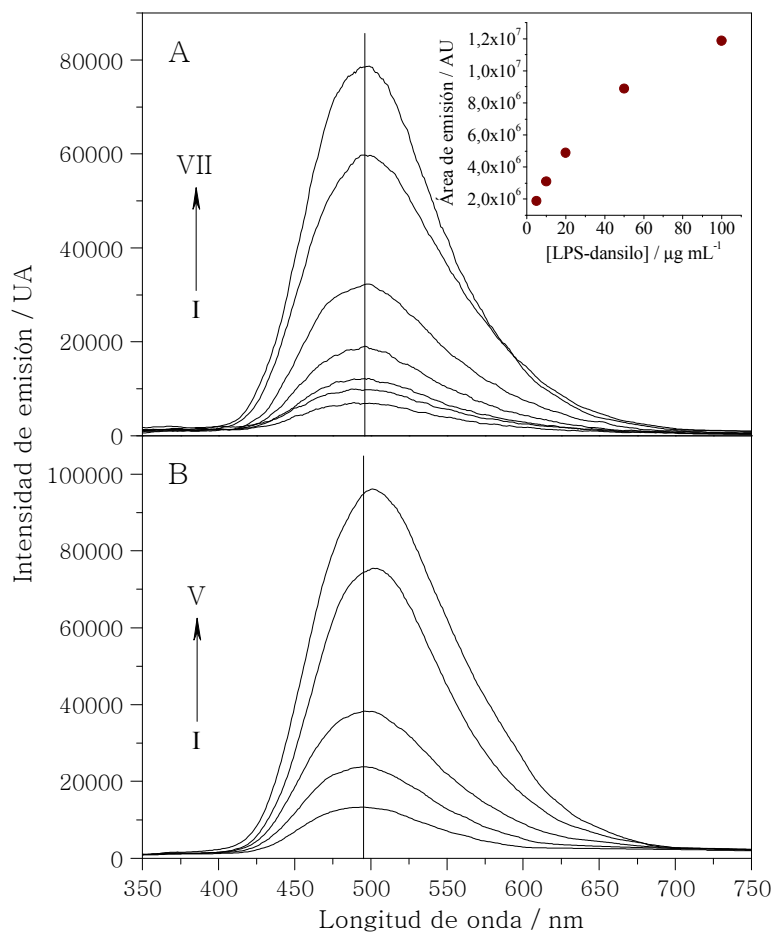


Figura 6.4: Espectros de fluorescencia en agua MilliQ de A) hidracina de dansilo. De I a VII: 0,6; 1,0; 1,3; 2,2; 4,5; 9,0; 12,0 μM . B) LPS-dansilo. De I a V: 5; 10; 20; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La línea perpendicular corresponde a 495 nm. Figura insertada: Área de emisión vs. [LPS-dansilo] en agua MilliQ.

6.3.2 – Conjugado LPS-PEG-HRP

La peroxidasa de rábano picante (HRP) empleada en la síntesis del conjugado con LPS corresponde a la isoenzima C. Esta isoenzima contiene seis residuos de lisina en su estructura [254], permitiendo su reacción, a través de los grupos aminos primarios de estos aminoácidos, con el LPS previamente activado con BrCN (Figura 6.5). Sin embargo, nuestros intentos de modificar directamente el LPS con la enzima no produjeron derivados con buena relación de conjugación. Esto puede entenderse considerando que, ambos, el LPS y la enzima son moléculas voluminosas, introduciendo por consiguiente, un alto grado de impedimento estérico.

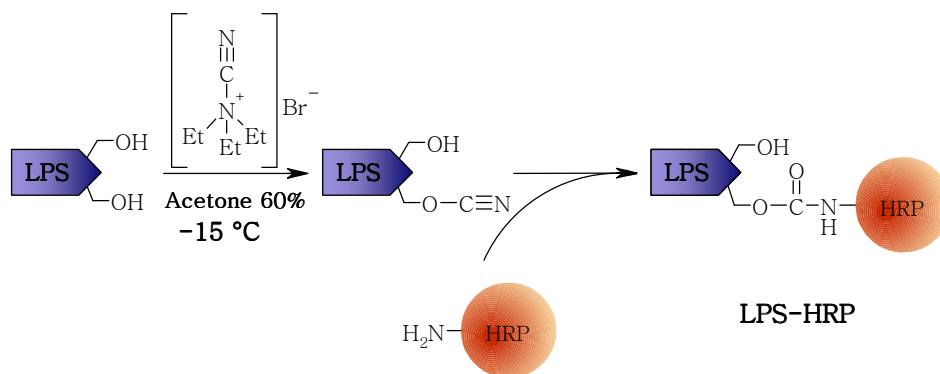


Figura 6.5: Pasos sintéticos involucrados en la conjugación directa de LPS con HRP.

La Figura 6.6 corresponde a la purificación cromatográfica de intercambio aniónico del conjugado de LPS con HRP obtenido en estas condiciones. En el primer pico eluye la enzima que no reaccionó con el LPS, mientras que el segundo, correspondiente a la elución en condiciones de alta fuerza iónica, se asigna al conjugado LPS-HRP. Puede notarse la baja intensidad de señal que presenta el segundo pico, indicando un bajo nivel de derivatización del lipopolisacárido. Esta fracción se colectó, dializó y caracterizó por su contenido de Kdo y HRP arrojando una relación de conjugación de 4 nmoles de HRP por mg de LPS.

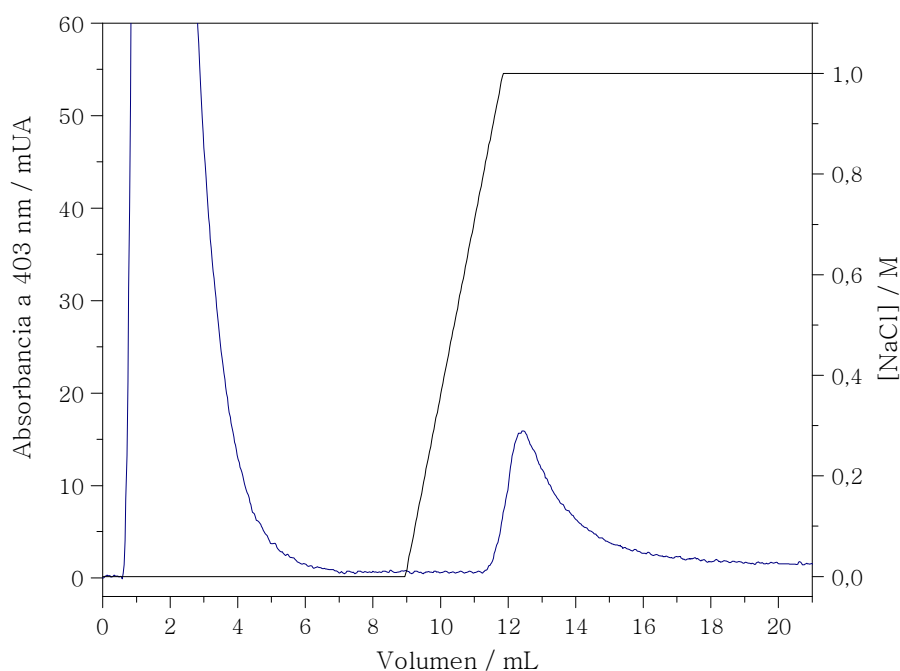


Figura 6.6: Cromatografía de intercambio aniónico para la separación de LPS-HRP de HRP sin reaccionar (línea azul). El cambio en la concentración de NaCl está dado por la línea negra. 100 μL de volumen de inyección (aprox. 300 μg de LPS-HRP impuro).

Considerando el bajo rendimiento de reacción que se obtiene cuando se hace reaccionar directamente la enzima con el lipopolisacárido, se modificó la estrategia sintética introduciendo un nuevo paso. Previo a su reacción con el LPS, a la peroxidasa se le introdujo una molécula espaciadora, FMOC-PEG-COOH (Figura 6.7), de modo de facilitar la reacción de modificación del LPS. La molécula espaciadora es un polietilenglicol bifuncional, el cual puede unirse a la enzima con buen rendimiento. En uno de sus extremos posee un grupo amino primario protegido por FMOC, mientras que en el otro posee un grupo carboxílico, por donde se une a la enzima.

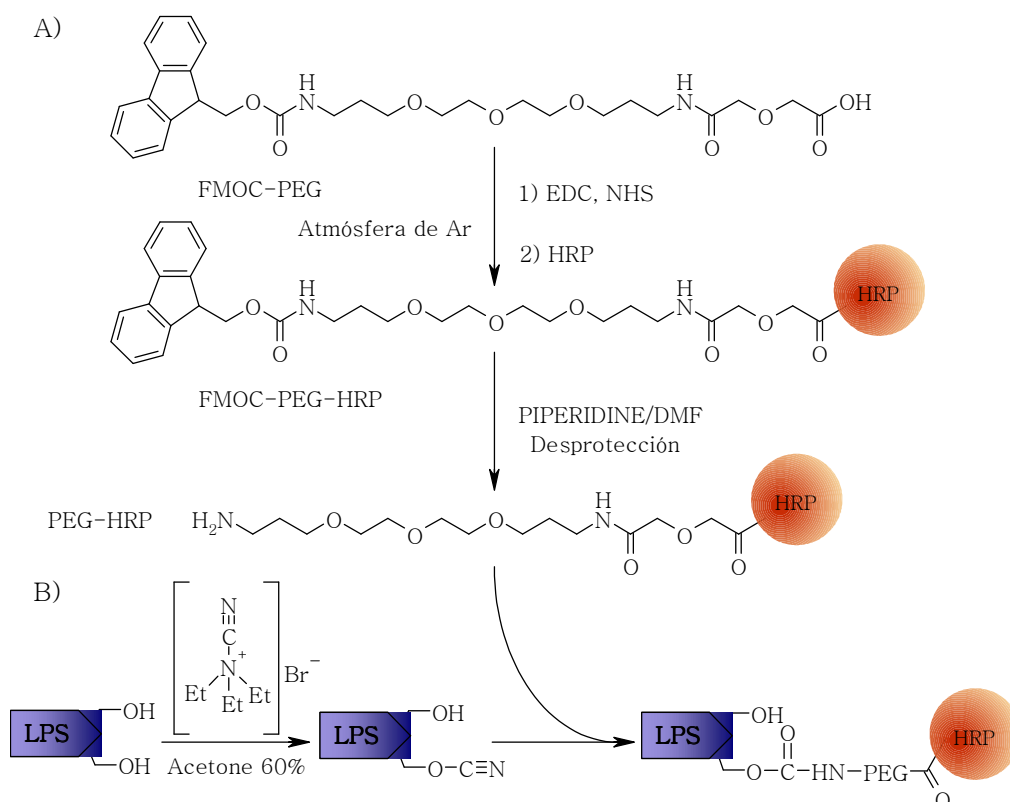


Figura 6.7: Pasos sintéticos involucrados en la síntesis de LPS-PEG-HRP. A) Modificación de HRP con FMOC-PEG-COOH. B) Conjugación de LPS con H₂N-PEG-HRP.

La incorporación de la molécula espaciadora a la enzima puede comprobarse por la aparición de una banda aguda a 300 nm, en el espectro de absorción de la HRP modificada (Figura 6.8 B), correspondiente al grupo protector FMOC. Esta señal no aparece en el espectro de la enzima nativa (Figura 6.8 A).

Los espectros de MALDI para la HRP y para su derivado, FMOC-PEG-HRP (Figura 6.9) muestran un corrimiento de masa molecular correspondiente a 2560 unidades (Figura insertada). Este cambio en la masa de la HRP respecto a su derivado

con polietilenglicol corresponde a la incorporación de aproximadamente 4 moléculas espaciadoras. También, puede notarse para la enzima modificada, picos más anchos en relación a lo que se observa con la enzima nativa. Esta observación se debe a las diferentes relaciones de modificación que se obtienen para Fmoc-PEG-HRP, generando por consiguiente una mayor dispersión en los valores de m/z para los iones $[M + 2H]^{2+}$, $[M + H]^+$, $[2M + H]^+$, etc. Entre otras cosas, la espectrometría de masa MALDI permitió monitorear la desprotección del Fmoc (Figura 6.9 C), observándose un corrimiento a menores valores de m/z debido a la pérdida de esta porción de la molécula espaciadora.

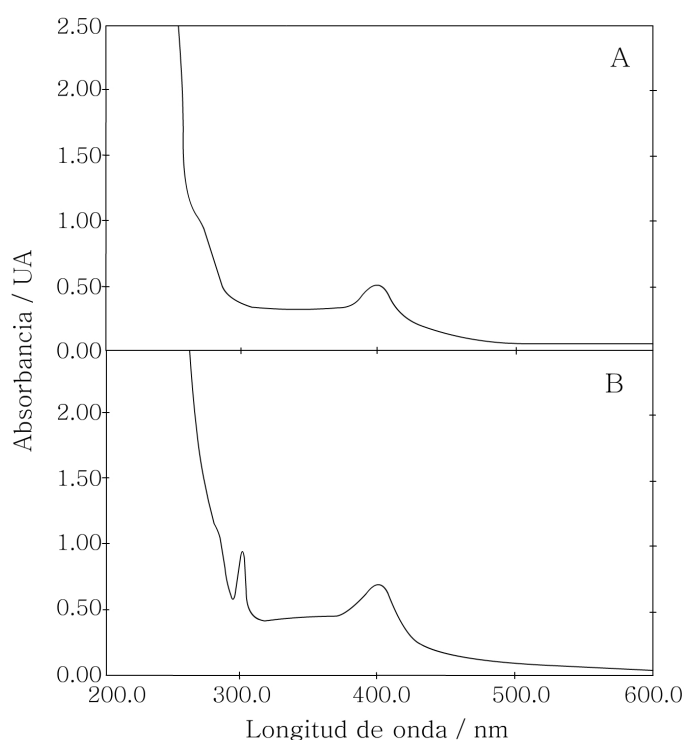


Figura 6.8: Espectros de absorción en DMF de A) HRP nativa y B) HRP modificada con el polietilenglicol.

Por otro lado, también se ha obtenido la evidencia de la remoción del Fmoc en piperidina 20 % v/v en DMF por cromatografía en placa delgada. Para ello se empleó una mezcla de acetato de etilo:dicloro metano 2:1 como fase móvil, sembrando el Fmoc-PEG-COOH antes y después del tratamiento con el agente desprotector. Pudo observarse para el caso del Fmoc-PEG-COOH un R_f de 0,2 (revelado con lámpara UV a 254 nm), mientras que el polietilenglicol tratado con piperidina presentó dos manchas, una con R_f 0,2 (revelado con H_2SO_4 10 % v/v y posterior calentamiento)

correspondiente al $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$ y otra con R_f 0,6 correspondiente al Fmoc (revelado con lámpara UV a 254 nm). Un blanco de piperidina 20 % v/v en DMF permitió distinguir la señal proveniente del agente desprotector.

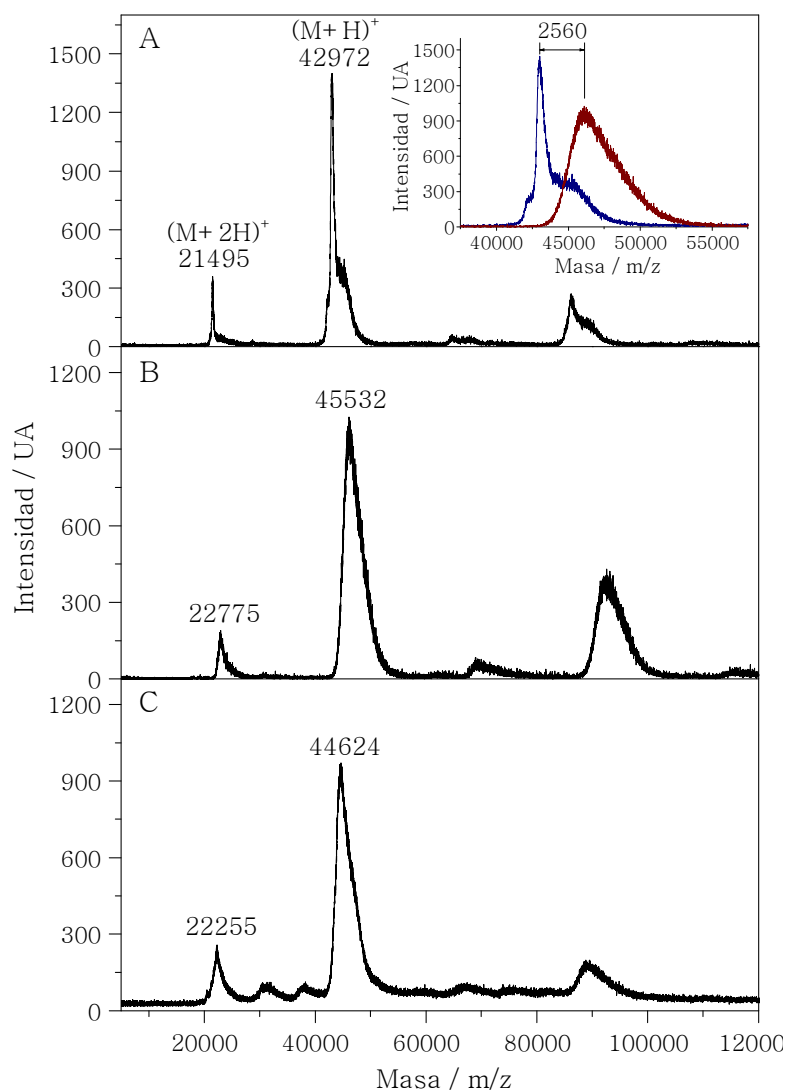


Figura 6.9: Espectrometría de masa MALDI en modo positivo de A) HRP, B) Fmoc-PEG-HRP, C) $\text{H}_2\text{N-PEG-HRP}$. Figura insertada: Diferencia de m/z entre los iones $[\text{M} + \text{H}]^+$ de HRP (azul) y Fmoc-PEG-HRP (bordó).

Como ha sido descripto anteriormente, una fracción purificada de LPS de *Salmonella Minnesota* fue activada con BrCN para su posterior modificación con un derivado de polietilenglicol de la HRP. La reacción procede a través del grupo amino primario en el extremo de la molécula espaciadora. El producto de la reacción, previamente desalado y dializado, fue purificado por cromatografía de intercambio aniónico. La Figura 6.10 muestra el perfil de elución, donde el primer pico corresponde

a PEG-HRP que no ha reaccionado. Dado el pH al cual se realiza la purificación cromatográfica, PEG-HRP posee carga positiva, de acuerdo con el punto isoeléctrico de la isoenzima C, cuyo valor es 9 [255]. Por el otro lado, LPS-PEG-HRP posee carga negativa debida a la presencia de grupos fosfato en la región del lípido A en el LPS. Consecuentemente, al aumentar la fuerza iónica de la fase móvil, el LPS es removido de la columna, visualizándose un segundo pico de elución. Las áreas de cada pico permiten estimar que aproximadamente la mitad de la peroxidasa ha reaccionado con el LPS.

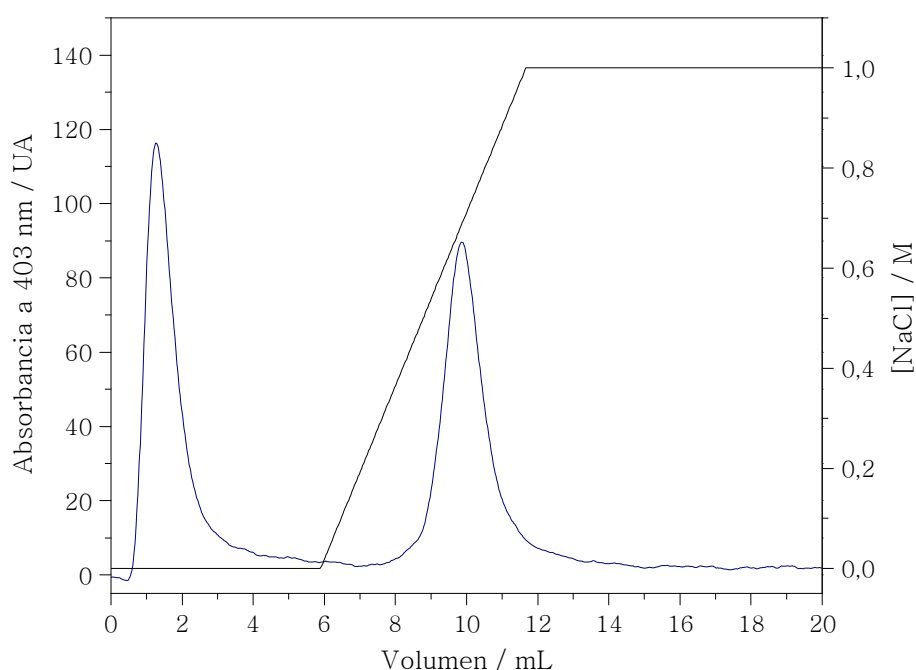


Figura 6.10: Cromatografía de intercambio aniónico para la separación de LPS-PEG-HRP de HRP sin reaccionar (línea azul). El cambio en la concentración de NaCl está dado por la línea negra. 100 μ L de volumen de inyección (aprox. 300 μ g de LPS-PEG-HRP impuro).

El producto correspondiente al segundo pico se colectó, dializó y caracterizó por electroforesis en gel de poliacrilamida mostrando claras diferencias entre el perfil de migración de la enzima y el LPS (Figura 6.11). El conjugado muestra un típico patrón de escalera como los que se observan en las muestras de LPS (Figura 3.4). Es importante resaltar que el conjugado presenta una movilidad superior al LPS, aunque su masa molar es mayor. Esto se debe, probablemente, al hecho de que el tratamiento desnaturalizante expone los sitios hidrofóbicos de la enzima, los cuales se rodean de SDS, resultando en una mayor migración del conjugado, mientras que para el LPS este tratamiento es solo efectivo en la región del lípido A. También, puede observarse que

en el perfil de migración del conjugado no hay bandas en la posición correspondiente al LPS sin modificar, indicando que el conjugado no está impurificado con LPS libre.

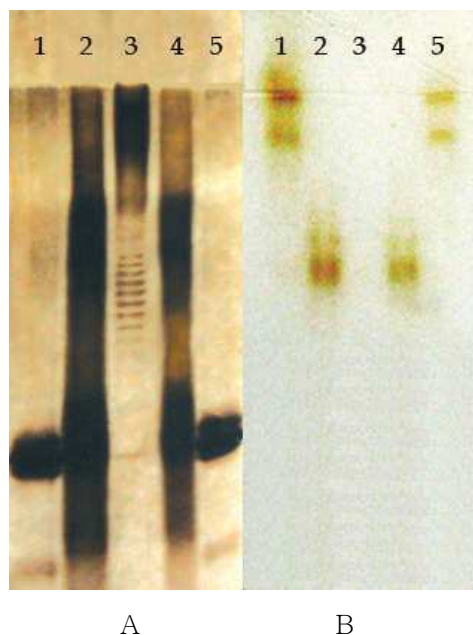


Figura 6.11: Electroforesis en gel de poliacrilamida 12,5 % con SDS. A) Condiciones desnaturalizantes, revelado por tinción con plata. B) Condiciones no desnaturalizantes, revelado por actividad de peroxidasa. 1) HRP 4 µg; 2) LPS-PEG-HRP 12 µg; 3) LPS 6 µg; 4) LPS-PEG-HRP 6 µg; 5) HRP 2 µg.

La electroforesis en condiciones no desnaturalizantes proporciona información valiosa respecto de las características del conjugado. En este caso, se empleó una técnica de revelado específica para peroxidasa, la cual no solo permite visualizar la migración de la enzima sino que además confirma su actividad enzimática. Puede observarse en el gel revelado por actividad que la peroxidasa sin modificar apenas se mueve del lugar de siembra, mientras que el conjugado, de mayor masa molar pero también mayor carga, recorre una mayor distancia (Figura 6.11 B). Este comportamiento sugiere que las regiones hidrofóbicas de la proteína no son expuestas durante el tratamiento en condiciones no desnaturalizantes; en consecuencia la proteína no puede ser rodeada y cargada efectivamente por el SDS. En el caso del conjugado, la presencia del lípido A de por sí ya proporciona carga y además permite una mayor interacción con el tensioactivo. Los resultados en este gel confirman que no hay HRP libre en la muestra de conjugado. Todos estos resultados son consistentes con la conclusión de que este método permite la síntesis de un conjugado de LPS con HRP.

A partir del contenido de HRP y Kdo del conjugado puede calcularse la relación de conjugación. Con este propósito se evaluó el contenido de enzima a partir de su absorción a 403 nm (Figura 6.12), correspondiente a la banda Soret del grupo hemo, y mediante el método Bradford [203] empleando HRP como estándar de calibración. La concentración de peroxidasa se determinó, a partir de su absorbancia a 403 nm, asumiendo $102000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como su coeficiente de absorción molar [127].

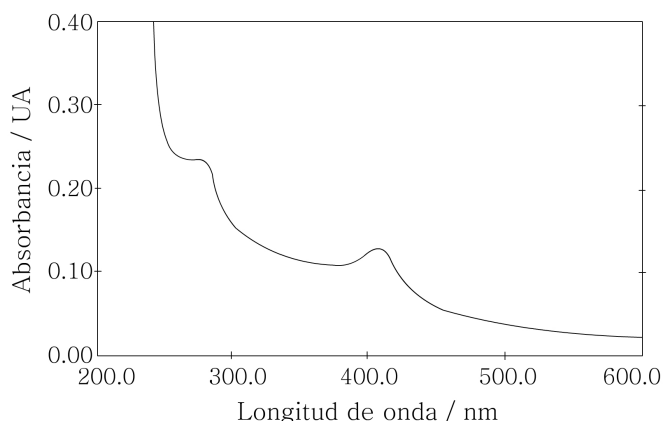


Figura 6.12: Espectro de absorción en agua MilliQ de LPS-PEG-HRP $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Los resultados expuestos en la Tabla 6.1 ponen en evidencia un hecho fundamental; no toda la enzima unida al LPS conserva el grupo hemo intacto. Esto es claro observando que la concentración de HRP obtenida por absorción a 403 nm es inferior a la que se obtiene por el ensayo colorimétrico (sección 3.5.4.2). La conjugación real que se obtiene corresponde a 28 nmoles de proteína por mg de LPS, sin embargo, alrededor del 55 % de esa proteína no conserva intacto el centro catalítico, afectando en consecuencia su actividad enzimática. Si bien, su actividad catalítica, es suficiente para desarrollar coloración, como puede visualizarse en la Figura 6.11 B, su valor cae drásticamente respecto de su valor inicial. Considerando una conjugación de 28 nmoles de enzima por mg de LPS, la actividad se redujo de 280 a 6 U mg^{-1} , cifra que aumenta a 14 U mg^{-1} considerando la relación de conjugación correspondiente a la medida de absorbancia a 403 nm.

Respecto a la pirogenicidad del lipopolisacárido, el conjugado posee una actividad endotóxica de $1,1 \text{ UE ng}^{-1}$, correspondiente a la conservación del 65 % de la actividad original de la fracción de LPS empleada ($1,7 \text{ UE ng}^{-1}$), lo que significa un progreso significativo respecto de los conjugados sintetizados mediante tratamiento con periodato de sodio (capítulo 5).

Método de análisis	Concentración de proteína ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ¹	Relación de conjugación (nmoles por mg de LPS)
Absorbancia a 403 nm	48,4	7
Bradford	110	28

¹ Correspondiente al análisis de una solución de LPS-PEG-HRP 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabla 6.1: Resultados de la caracterización proteica del conjugado LPS-PEG-HRP.

6.4 – Actividad enzimática de HRP. Medios para su conservación y almacenamiento

La peroxidasa de rábano picante (HRP) es ampliamente utilizada en numerosos ensayos: inmunoquímica, síntesis orgánica y biosensores [148]. La HRP pertenece a las enzimas de moderada estabilidad [256, 257], particularmente su estabilidad decrece significativamente en soluciones diluidas (menores de 1 nM) y en presencia de ciertas sustancias, por ejemplo, surfactantes [256]. Por consiguiente, es de vital importancia determinar las condiciones óptimas para su almacenamiento y el de sus conjugados. En presencia de aditivos solubles (sales, polialcoholes, surfactantes, etc.), se afecta la hidratación proteica, resultando en la alteración de la estabilidad y actividad de la enzima. Por consiguiente, variando el ambiente, es posible afectar la constante de velocidad de inactivación proteica [258]. Se han desarrollado un gran número de medios de estabilización para soluciones concentradas de HRP o sus conjugados. La lista incluye sales de calcio, fosfatos y citratos de sodio, polialcoholes, polietilenglicoles y proteínas [259–262].

Muestra	Condición	Actividad enzimática (U mg^{-1})
HRP	Sin tratar	280
FMOC-PEG-HRP	Purificado y liofilizado	130
NH ₂ -PEG-HRP	Después del paso de desprotección	75
LPS-PEG-HRP	Purificado y liofilizado	14

Tabla 6.2: Actividad enzimática de HRP a lo largo de la síntesis de LPS-PEG-HRP.

Se ha observado que durante el proceso de síntesis de conjugados de LPS con HRP, la pérdida de actividad enzimática de la peroxidasa es muy severa (Tabla 6.2). En consideración, nos propusimos estudiar el efecto de distintos aditivos sobre la actividad catalítica de la enzima. En particular, hemos usado soluciones acuosas de cloruro de calcio, alcohol etílico, glicerol y hemin (grupo hemo proveniente de sangre bovina, Sigma, N° de catálogo: H9039) de modo de evaluar la posibilidad de reconstituir la actividad catalítica de la enzima. La Tabla 6.3 resume los resultados obtenidos.

Muestra	Condición	Actividad enzimática inicial (U mg ⁻¹)	Actividad enzimática final (U mg ⁻¹)
LPS-PEG-HRP	12 horas en hemin 50 % p/p ¹ CaCl ₂ 30 mM a 4 °C	14	Precipitación No pudo medirse
	12 horas en hemin 50 % p/p ¹ a 4 °C	14	12,8 ²
FMOC-PEG-HRP	12 horas en hemin 50 % p/p ¹ CaCl ₂ 30 mM a 4 °C	130	172,2 ²
	12 horas en hemin 50 % p/p ¹ a 4 °C	130	122,2 ²
HRP	7 días en glicerol 20% v/v, etanol 10 % v/v a 4 °C	280	276
	30 días en glicerol 20 % v/v, etanol 10 % v/v, CaCl ₂ 30 mM a 4 °C	280	262
	240 días en glicerol 20 % v/v, etanol 10 % v/v, CaCl ₂ 30 mM a 4 °C	280	224

¹ 50 % p/p respecto de la masa de HRP.

² Medido después de purificado usando dos columnas de desalado HiTrap en serie empleando buffer fosfato 15 mM pH 7,5 con NaCl 15 mM como fase móvil.

Tabla 6.3: Efecto de distintos aditivos sobre la actividad enzimática de HRP. En todos los casos las soluciones se prepararon en buffer fosfato 15 mM pH 7,5 con NaCl 15 mM.

Las sales de calcio estabilizan notablemente la enzima, dada que la integridad de su sitio activo depende de la presencia de Ca²⁺ [125]. Las sales de calcio se hidratan débilmente y en consecuencia los iones Ca²⁺ interaccionan fácilmente con las proteínas afectando significativamente su conformación. Se ha sugerido que estas sales actúan como agentes estabilizantes de conjugados de HRP [259]. Los polialcoholes, en particular el glicerol, se han implementado ampliamente en la estabilización de

proteínas. Su efecto protector aumenta con la concentración y con la longitud de la cadena carbonada [263]. Respecto al etanol, a diferencia de otros alcoholes, actúa como un agente estabilizante de la estructura acuosa del entorno proteico [264].

La adición de grupo hemo a las soluciones de FMOC-PEG-HRP y LPS-PEG-HRP no tuvo una influencia positiva sobre la actividad de la enzima, sin embargo, cuando se lo empleó en conjunto con CaCl_2 , la actividad catalítica se incrementó en un 30 % denotando reconstitución del sitio activo de la peroxidasa. El tratamiento con Ca^{2+} sobre el conjugado LPS-PEG-HRP resultó en su precipitación debido a la agregación del lipopolisacárido, lo cual hace que sea incompatible el uso de este aditivo.

Combinaciones de glicerol 20 % v/v, etanol 10 % v/v y CaCl_2 30 mM, siempre en buffer fosfato 15 mM pH 7,5 con NaCl 15 mM, se han probado como mezclas estabilizantes de peroxidasa. Incluso en ausencia de Ca^{2+} , el comportamiento de estas preparaciones es satisfactorio, conservando el 100 % de la actividad de la enzima durante el período de 7 días a 4 °C. Esta fórmula permite conservar conjugados de LPS con HRP dado que no genera la precipitación de la endotoxina. Esta capacidad estabilizante mejora con la adición de CaCl_2 permitiendo conservar el 90 % de la actividad de la enzima durante el período de 30 días y el 80 % durante 240 días.

La implementación de este tipo de formulaciones es de vital importancia para la conservación de las propiedades de los conjugados de LPS con HRP sintetizados. Esto hace posible que los derivados de LPS puedan ser utilizados en distintas etapas del desarrollo de un ensayo sin afectarse sus características y con esto los resultados consiguientes.

6.5 – Sumario

Se ha mostrado que la activación de LPS con bromuro de cianógeno en acetona acuosa es un método de activación conveniente para su posterior modificación con moléculas conteniendo un grupo hidracina o amino primario. El mismo concepto puede extenderse a hidracidas.

Este método permite la preparación de conjugados de dansilo con una excelente relación de conjugación (330 nmoles de dansilo por mg de LPS), conservando prácticamente la actividad endotóxica original del LPS, indicando que probablemente, la modificación se lleva a cabo en la región del antígeno O de la molécula, lejos del lípido A. Esta estrategia sintética es muy conveniente, dado que existen un gran número de fluoróforos con grupos hidracina o amino primario que pueden ser introducidos al LPS.

La producción de un derivado de LPS con una proteína también es posible, introduciendo primero una molécula espaciadora, lo cual es una práctica habitual en la conjugación de carbohidratos con proteínas [265, 266]. Por esta vía, la conjugación de una proteína con LPS nos permitió obtener un derivado con excelente relación de conjugación (28 nmoles de HRP por mg de LPS), conservando una buena actividad endotóxica ($1,1 \text{ UE ng}^{-1}$). En lo que respecta a la actividad enzimática de la peroxidasa, es notable su disminución a lo largo de la síntesis del conjugado. Es claro, en consecuencia, que es apremiante el desarrollo de una nueva estrategia de síntesis para este tipo de derivados. En este sentido, en el capítulo 7 se incorpora una alternativa en medio acuoso a la síntesis descrita en este capítulo. Esta nueva estrategia en conjunto con el uso de las formulaciones estabilizantes de peroxidasa desarrolladas provee un panorama más prometedor a la química de derivados de LPS con HRP.

Capítulo *7*

Conjugados de LPS: Activación con CDAP



7.1 – Introducción

La identificación de los sitios de unión a LPS y la identificación de sus receptores de membrana son importantes para el desarrollo de drogas para el tratamiento de la sepsis. El uso de derivados de LPS con estabilidad funcional constituye una herramienta útil en el estudio de las interacciones endotoxina-receptor en ensayos farmacológicos. Dada la complejidad de la molécula, la síntesis de conjugados de LPS no es una tarea sencilla. En solución, las endotoxinas no constituyen una muestra homogénea, y forman agregados de alta masa molecular a las concentraciones requeridas para la síntesis de sus derivados [17, 22, 153].

En el capítulo 6, se ha introducido el desarrollo de un método eficiente para la conjugación de LPS con sondas conteniendo los grupos funcionales hidracina y amino primario. La modificación del LPS involucró su activación con bromuro de cianógeno y posterior conjugación con el nucleófilo correspondiente. Este procedimiento sintético permitió obtener derivados de LPS con una excelente relación de conjugación, preservando su actividad endotóxica y ofreciendo la posibilidad de combinar al LPS con una gran variedad de sondas conteniendo los mencionados grupos funcionales. A pesar de todas estas ventajas, cabe recordar que el BrCN es uno de los reactivos más peligrosos de manipular en el laboratorio, el paso de reacción debe realizarse a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que limita el uso de ciertos reactivos, acotando la elección de un solvente o mezcla de solventes adecuados. Todas estas condiciones no son las más adecuadas si se intenta modificar LPS con una enzima como HRP.

La activación de los grupos hidroxilos de un carbohidrato también puede lograrse empleando 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP). En este caso, la activación y la modificación subsiguiente del carbohidrato se lleva a cabo en condiciones más suaves, en solvente acuoso (Figura 7.1), un ambiente más adecuado para una enzima. Por otro lado, en un medio acuoso, el LPS presenta una elevada tendencia a formar agregados. Teniendo todo esto en mente, en este capítulo, se presenta la conjugación de LPS en medio acuoso en presencia de moléculas anfifílicas. Una fracción purificada de LPS de *Salmonella Minnesota* se conjuga con peroxidasa de rábano picante, empleando una molécula PEG espaciadora, y con una sonda fluorescente (hidracina de dansilo) obteniendo buenas relaciones de conjugación, preservando las propiedades endotóxicas del LPS y la actividad enzimática del HRP.

7.2 – Experimental

7.2.1 – Reactivos

1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP), cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3), dodecil sulfato de sodio (SDS), deoxicolato de sodio (NaDC) y triton X-100 fueron provistos por Sigma. El diamino polietilenglicol Mr 1000 (DAPEG) fue provisto por NOF (Figura 7.5).

7.2.2 – Síntesis del conjugado LPS-dansilo

La fracción 11-12 del LPS purificado (sección 3.2.2.2) se utilizó para realizar la conjugación. 1 mg de LPS de *S. Minnesota* se disolvió en 0,5 mL de agua MilliQ. La solución resultante se agitó en vórtex durante 3 minutos y posteriormente se sonicó durante 15 minutos a 25 °C. Luego, sobre esta solución se adicionaron 20 μL de CDAP en acetonitrilo 100 mg mL^{-1} y 30 segundos después 20 μL de TEA 0,2 M en agua. La mezcla se dejó reaccionar durante 150 segundos a 25 °C, oscuridad y con agitación. Luego de transcurridos los 150 segundos se agregaron 500 μL de una solución 4,0 mg mL^{-1} de hidracina de dansilo disuelta en buffer borato de sodio 0,1 M pH 9,3. La solución resultante se dejó reaccionar durante 2 horas a 25 °C, en oscuridad y con agitación. La reacción se detuvo por agregado de 50 μL de etanolamina.

El dansilo que no reaccionó se removió haciendo pasar la solución por dos columnas de desalado HiTrap en serie (GE Healthcare de 5 mL de capacidad cada una) empleando como buffer de elución Hepes 50 mM pH 7,5 a un flujo de 2 mL min^{-1} . Luego, el conjugado se dializó contra agua MilliQ usando tubos de corte molecular 3500 a 4 °C durante 24 horas en oscuridad. El producto resultante se liofilizó y caracterizó por espectroscopía de fluorescencia (sección 3.5.1), su contenido de Kdo (sección 3.2.2.2) y su actividad endotóxica (sección 3.2.2.2).

7.2.3 – Síntesis del conjugado LPS-dansilo empleando compuestos anfifílicos

La síntesis es similar a la presentada previamente con la excepción de que se agrega un compuesto anfifílico (deoxicolato, SDS o triton). Se usaron diferentes concentraciones las cuales serán indicadas a lo largo de la sección de resultados del presente capítulo. El tratamiento realizado para dispersar el lipopolisacárido es el

siguiente: a 0,5 mL de una solución acuosa de LPS 2 mg mL⁻¹ se le agregan 0,5 mL de solución acuosa de uno de los compuestos anfífilos en una concentración dada y 50 µL de EDTA 2,5 mM. La solución se mantuvo bajo agitación durante 30 minutos a 37 °C, luego se sonicó por 15 minutos y se volvió a agitar por 30 minutos a 37 °C. A la solución resultante, bajo constante agitación, se le adicionaron 20 µL de CDAP 100 mg mL⁻¹ en acetonitrilo y se continuó con el procedimiento descrito en el punto 7.2.2.

7.2.4 – Síntesis del conjugado LPS-PEG-dHRP

7.2.4.1 – Deglicosilación de la peroxidasa de rábano picante

La deglicosilación de la peroxidasa procede tratando una solución de HRP 10 mg mL⁻¹ en agua MilliQ con periodato de sodio en presencia de CaCl₂ 10 mM bajo agitación a 25 °C durante 30 minutos. Con la intención de evaluar las condiciones más propicias de oxidación de la enzima, se emplearon distintas concentraciones de periodato de sodio (Figura 7.6 y Figura 7.9). Finalizado el tiempo indicado, la reacción se detuvo por agregado de etilenglicol dejando reaccionar por 30 minutos. La enzima deglicosilada (dHRP) se separó de los sacáridos de baja masa molecular y el resto de los reactivos por cromatografía de exclusión por tamaño empleando dos columnas de desalado HiTrap en serie (GE Healthcare de 5 mL de capacidad cada una) con buffer bicarbonato de sodio 100 mM pH 9,5 como fase móvil a un flujo de 2 mL min⁻¹. La fracción correspondiente a la dHRP purificada se dividió en dos: una fracción se caracterizó por su actividad enzimática (sección 3.5.3) y se reservó para su conjugación con DAPEG (sección 7.2.4.2); la otra fracción se dializó contra agua MilliQ durante 24 h a 4 °C y liofilizada. El sólido resultante se sometió a espectrometría MALDI-TOF (sección 3.5.2).

7.2.4.2 – Modificación de dHRP con DAPEG

Sobre 0,5 mL de una solución 34 mM de DAPEG en buffer bicarbonato de sodio 100 mM pH 9,5 conteniendo NaCNBH₃ 10 mg mL⁻¹, se agregaron gota a gota, durante el período de 3 minutos, 1,5 mL de dHRP 3,5 mg mL⁻¹ proveniente de la purificación cromatográfica correspondiente a las distintas condiciones de oxidación empleadas. La mezcla resultante se dejó reaccionar por 2 horas, bajo agitación suave, en oscuridad y a 4 °C. Transcurrido el lapso, la reacción se detuvo por agregado de 50 µL de etanolamina dejando reaccionar por 30 minutos. Finalmente, la enzima modificada con el

polietilenglicol se purificó cromatográficamente haciendo pasar la mezcla de reacción por dos columnas de desalado HiTrap en serie (GE Healthcare de 5 mL de capacidad cada una) con buffer bicarbonato de sodio 100 mM pH 9,5 como fase móvil a un flujo de 2 mL min^{-1} . La fracción correspondiente a dHRP-PEG-NH₂ purificada se dividió en dos: una fracción se caracterizó por su actividad enzimática y se reservó para la cuantificación de aminos primarios (sección 7.2.4.3), mientras que la otra fracción se dializó contra agua MilliQ durante 24 h a 4 °C, se liofilizó y se analizó por espectrometría MALDI-TOF (sección 3.5.2).

7.2.4.3 – Cuantificación de grupos aminos primarios en dHRP-PEG-NH₂

7.2.4.3.1 – Modificación de dHRP-PEG-NH₂ con ferrocenoaldehído

100 μL de solución de dHRP-PEG-NH₂ o HRP $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ se agregaron sobre 900 μL de una solución de ferrocenoaldehído (Fc-CHO) 3 mM en buffer bicarbonato de sodio 100 mM pH 9,5 conteniendo NaCNBH₃ 10 mg mL^{-1} . La mezcla resultante se dejó reaccionar durante 2 horas a oscuras a 25 °C con agitación. Luego, la solución se desaló empleando dos columnas de desalado HiTrap en serie (GE Healthcare de 5 mL de capacidad cada una) con buffer HEPES 50 mM pH 7,5 como fase móvil a un flujo de 2 mL min^{-1} . La fracción correspondiente a la enzima modificada con el ferroceno se colectó y se destinó a su análisis por voltametría diferencial de pulso (DPV).

7.2.4.3.2 – Análisis por voltametría diferencial de pulso de dHRP-PEG-Fc

Las medidas por voltametría diferencial de pulso se llevaron a cabo empleando una celda estándar de 3 electrodos con un potencióstato (Autolab FRA2 Type III). El sistema consistió en un electrodo de trabajo de carbono vítreo de $0,07 \text{ cm}^2$ de área, una malla de platino como contraelectrodo y un electrodo de Ag/AgCl como referencia. Para establecer una relación entre la señal de corriente obtenida y el nivel de ferroceno en la enzima puede, conociendo el coeficiente de difusión de HRP, utilizarse el modelo descrito en la sección 2.2.4. Los parámetros empleados para la voltametría diferencial de pulso fueron los siguientes: tiempo de modulación (τ) 0,056 s; tiempo de intervalo (τ) 0,5 s; potencial inicial 0 V; potencial final 0,7 V; escalón de potencial 4,95 mV; amplitud de modulación (ΔE) 49,5 mV.

7.2.4.4 – Conjugación de LPS con dHRP-PEG-NH₂

3 mg de la fracción 11-12 de LPS de *S. Minnesota* se disolvieron en 1,5 mL de agua MilliQ. La solución resultante se agitó en vórtex durante 3 minutos y posteriormente se sonicó durante 15 minutos a 25 °C. Luego, sobre esta solución se agregaron 150 µL de EDTA 2,5 mM y 1,5 mL de deoxicolato de sodio 4,5 mM de forma tal de dar una concentración final de 2,25 mM correspondiente a 1,5 veces la CMC del deoxicolato de sodio [267]. La solución resultante se agitó durante 30 minutos a 37 °C, se sonicó por 15 minutos y nuevamente se agitó por 30 minutos a 37 °C de modo de favorecer la desagregación del lipopolisacárido. Luego se agregaron 60 µL de CDAP en acetonitrilo 100 mg mL⁻¹ y 30 segundos después 60 µL de TEA 0,2 M en agua. La mezcla se dejó reaccionar durante 150 segundos a 25 °C con agitación. Transcurridos los 150 segundos se agregaron 2 mL de dHRP-PEG-NH₂ 12 mg mL⁻¹ en buffer bicarbonato de sodio 0,1 M pH 9,5. La mezcla se dejó reaccionar durante 2 horas a 25 °C, en oscuridad y con agitación moderada. La reacción se finalizó por agregado de 100 µL de etanolamina dejando reaccionar por 30 minutos. Luego, el producto de la reacción se concentró a 3 mL usando una membrana de filtración de corte molecular 30000 y se purificó por cromatografía usando dos columnas de desalado HiTrap en serie (GE Healthcare de 5 mL de capacidad cada una) con buffer Tris 50 mM pH 6,5 como fase móvil a un flujo de 2 mL min⁻¹. Finalmente, la peroxidasa que no reaccionó se separó del conjugado por cromatografía de intercambio aniónico.

7.2.4.5 – Purificación cromatográfica del conjugado LPS-PEG-HRP

La separación cromatográfica de la enzima que no reaccionó se realizó en una columna de intercambio aniónico, ANX FF (high sub) (GE Healthcare de 20 mL de capacidad). 3 mL del conjugado impurificado en buffer Tris 50 mM pH 6,5, proveniente del desalado cromatográfico, se inyectaron en la columna. Los buffers de unión y elución empleados fueron, Tris 50 mM pH 6,5 y Tris 50 mM pH 6,5 conteniendo NaCl 1 M, respectivamente. La separación cromatográfica se realizó a un flujo de 4,0 mL min⁻¹. El buffer de unión se aplicó durante 6 volúmenes de columna (VC). La elución del conjugado se alcanzó con el buffer de elución empleando un gradiente de 0 a 100 % durante 3 VC, manteniendo el 100 % durante 3 VC de forma de asegurarse la completa elución del analito. La corrida cromatográfica se llevó a cabo a 25 °C registrando la absorbancia a 403 nm. Las fracciones correspondientes al conjugado se juntaron y se

concentraron a 3 mL empleando una celda de ultrafiltración Amicon Millipore modelo 8010 (10 mL de capacidad) con una membrana de filtración de corte molecular 30000. Luego, el concentrado se separó del NaCl usando dos columnas de desalado HiTrap en serie (GE Healthcare de 5 mL de capacidad cada una) con buffer Tris 50 mM pH 6,5 como fase móvil a un flujo de 2 mL min⁻¹. Finalmente, el conjugado LPS-PEG-HRP se dividió en una pequeña fracción destinada a los análisis de actividad enzimática (sección 3.5.3), Kdo (sección 3.2.2.2) y actividad pirogénica (sección 3.2.2.2) mientras que el remanente fue suplementado con glicerol a una concentración final del 20 % v/v, con etanol a una concentración final del 10 % v/v y conservado en oscuridad a 4 °C hasta su utilización.

7.3 – Resultados

7.3.1 – Conjugado LPS-dansilo

En los últimos años, la utilización de CDAP en la activación de los grupos hidroxilos en polisacáridos ha competido con el uso del BrCN. En comparación con el BrCN, CDAP es más sencillo de emplear, puede ser utilizado a un pH más suave, y presenta menos reacciones secundarias encontrando aplicaciones en la síntesis de vacunas de conjugados proteína-polisacárido y reactivos inmunológicos [268–270].

En nuestro primer intento por activar LPS con CDAP, una fracción de LPS purificada se disolvió en solución acuosa, y luego se sometió a sonicado de modo de obtener una solución homogénea. En segunda instancia se adicionó el CDAP y luego la hidracina de dansilo (Figura 7.1). Finalizada la reacción, el producto se purificó por cromatografía y se caracterizó por espectroscopía de fluorescencia y por su contenido de Kdo. Trabajando en estas condiciones, la relación de conjugación que se obtuvo fue muy pobre, apenas 1,4 nmoles de dansilo pudieron introducirse por mg de LPS. Por otro lado, la misma reacción aplicada sobre dextrano, un polisacárido soluble de monómeros de glucosa de 70 KDa de masa molecular, dio lugar a una relación de conjugación de 70 nmoles por mg de polímero. Estos resultados nos llevaron a pensar que la agregación del lipopolisacárido jugaba un rol fundamental en la activación de sus grupos hidroxilos.

A partir de los resultados antes descriptos, nos propusimos mejorar la exposición de los grupos hidroxilos del lipopolisacárido empleando distintas moléculas anfifílicas. De esta forma, favoreciendo la desagregación del LPS, la accesibilidad del

CDAP a los sitios blanco se facilitaría resultando en una activación más efectiva y consecuentemente una mayor conjugación.

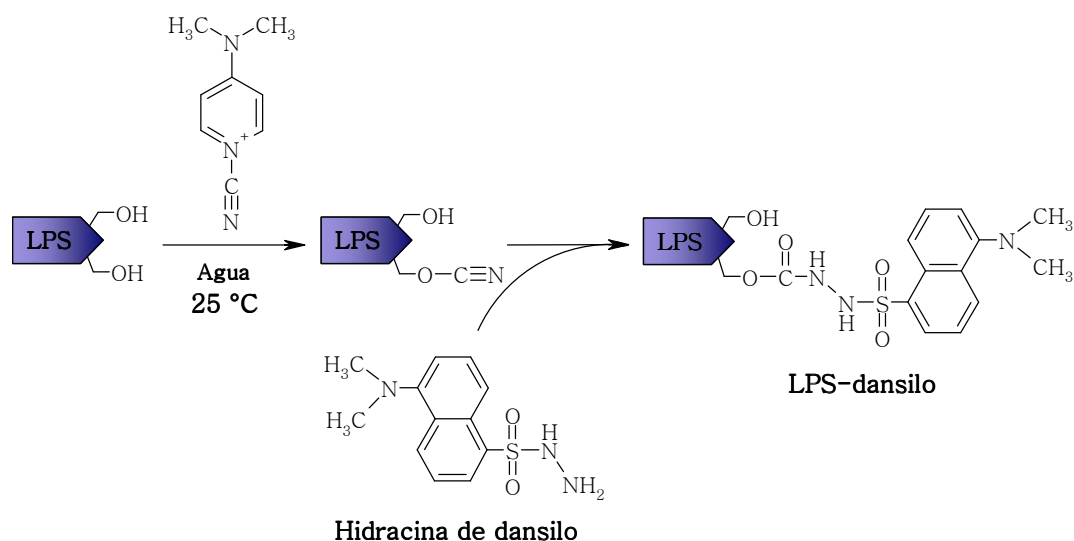


Figura 7.1: Pasos sintéticos involucrados en la conjugación de LPS con hidracina de dansilo.

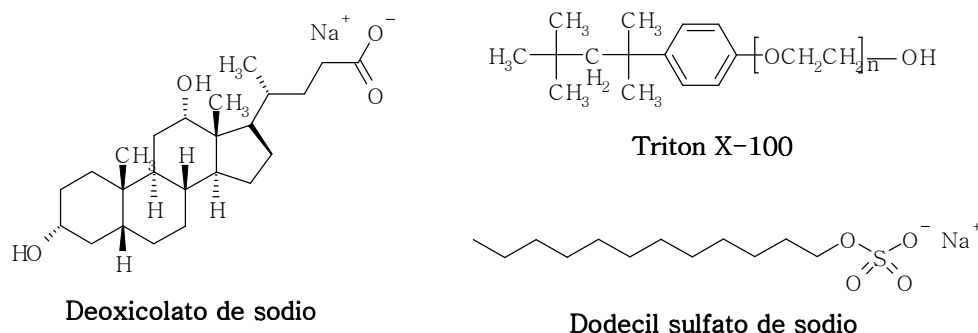


Figura 7.2: Moléculas anfifílicas ensayadas en la desagregación del LPS.

Tres moléculas distintas fueron ensayadas, deoxicolato de sodio (NaDC), triton X-100 y dodecil sulfato de sodio (SDS) (Figura 7.2). El uso de estas moléculas para desagregar al lipopolisacárido ha sido descrito en bibliografía [21, 22, 271, 272]. Triton X-100 es un tensioactivo no iónico, mientras que el dodecil sulfato de sodio y el deoxicolato de sodio son iónicos con carga negativa. El efecto desagregante sobre el LPS, se puede atribuir principalmente a la interacción de sus regiones hidrofóbicas con los ácidos grasos del lípido A. Es muy importante considerar, para una desagregación óptima, el número de moléculas necesarias para rodear al lípido A, pero también la concentración del surfactante en la cual se presentará una interacción más fuerte

consigo mismo que con el lípido A. Por lo tanto, debe considerarse la concentración micelar crítica de cada uno de los tensioactivos empleados (Tabla 7.1).

Detergente	CMC ¹ (mM)	# Agregación	Mr Micela
SDS	8,1	84	24200
Triton X-100	0,25	140	90000
NaDC	1,5	5	2000

¹ Datos correspondientes en agua [273].

Tabla 7.1: Propiedades de los compuestos anfifílicos ensayados para desagregar al LPS.

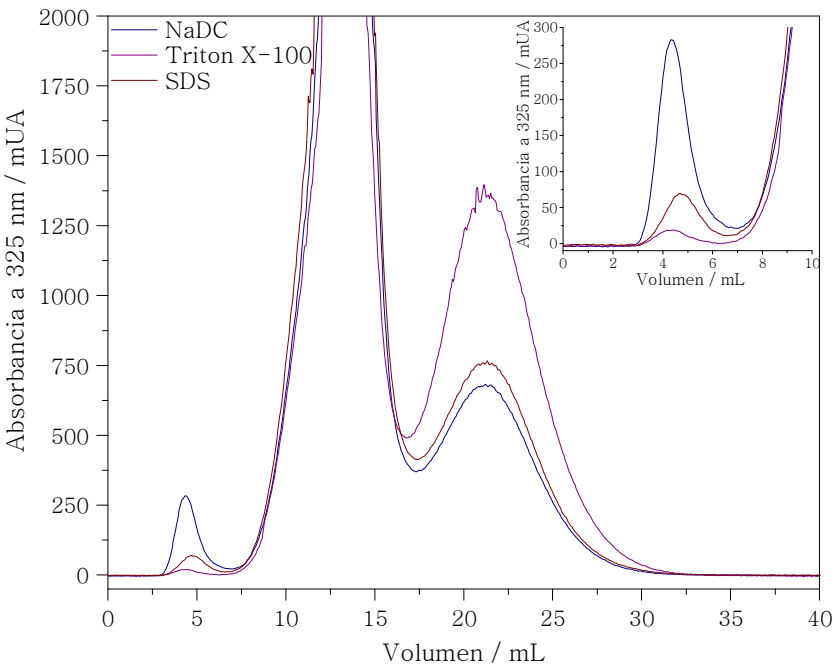


Figura 7.3: Purificación cromatográfica del conjugado LPS-dansilo usando los tensioactivos en una concentración de 1,5 x CMC. Se inyectó 1 mL de la solución de reacción. Figura insertada: Ampliación del mismo perfil.

La misma cantidad de LPS (0,5 mL de LPS 2 mg mL⁻¹) se disolvió en presencia de uno de los compuestos anfifílicos a una dada concentración más 50 µL de EDTA 2,5 mM, y luego se activó mediante el agregado de CDAP. Finalmente, la adición de hidracina de dansilo da lugar a la formación del conjugado fluorescente de LPS. El

exceso de dansilo que no reaccionó se removió por cromatografía de exclusión (Figura 7.3) y el producto deseado se dializó y caracterizó por espectroscopía de fluorescencia y su contenido de Kdo. De esta forma, se evaluó la relación de conjugación de modo de determinar las mejores condiciones de síntesis.

En la Figura 7.4 puede observarse el efecto que tiene cada surfactante sobre el rendimiento de conjugación. En el caso del SDS no hay una mejora significativa a medida que aumenta su concentración. En este caso, la mejor relación de conjugación (4 nmoles por mg de LPS), que es apenas tres veces mayor que la que se obtiene en ausencia de tensioactivo (1,4 nmoles por mg de LPS), se obtiene para una concentración igual a su valor de concentración micelar crítica.

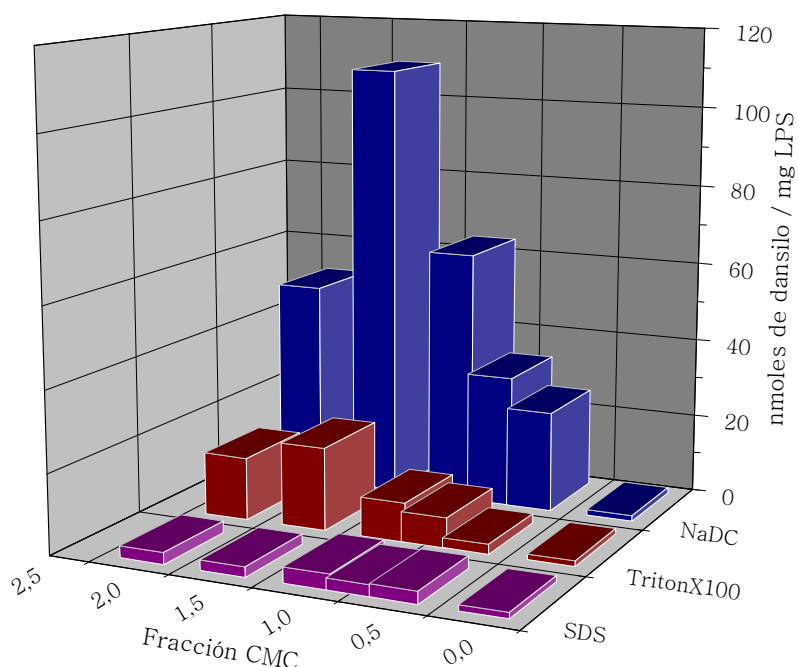


Figura 7.4: Modificación de LPS con hidracina de dansilo en presencia de moléculas anfifílicas a distintas concentraciones.

El panorama cambia significativamente para el triton X-100 y el NaDC. El uso de estos compuestos favorece notablemente la conjugación respecto a lo obtenido en su ausencia. Para estos dos casos, la mejor relación de conjugación se obtiene cuando su concentración corresponde a 1,5 veces la concentración micelar crítica. Este comportamiento puede interpretarse de la siguiente forma: a bajas concentraciones no hay suficiente surfactante para desagregar completamente al LPS, mientras que a concentraciones elevadas prevalece la interacción del surfactante consigo mismo. Esta

conducta se corresponde con la disminución de la conjugación a concentraciones superiores a 1,5 veces la CMC.

De los últimos dos tensioactivos mencionados, el NaDC es el que da lugar a la mejor relación de conjugación, 110 nmoles de dansilo por mg de LPS. El conjugado sintetizado en estas condiciones fue evaluado respecto de su actividad endotóxica rindiendo una actividad correspondiente al 70 % ($0,45 \text{ UE ng}^{-1}$) de la actividad endotóxica original de la fracción de LPS empleada ($0,65 \text{ UE ng}^{-1}$).

7.3.2 – Conjugado LPS-PEG-HRP

En el capítulo anterior se ha presentado la modificación de LPS con HRP a través de su activación con BrCN. El conjugado sintetizado presentaba una excelente relación de conjugación conservando el comportamiento endotóxico del LPS. Sin embargo, el uso de solventes orgánicos en los diferentes pasos de reacción ha tenido como consecuencia una reducción notable en la actividad biológica de la enzima. Por tal motivo, en este caso se ha implementado una nueva estrategia sintética de modo de evitar la inactivación enzimática.

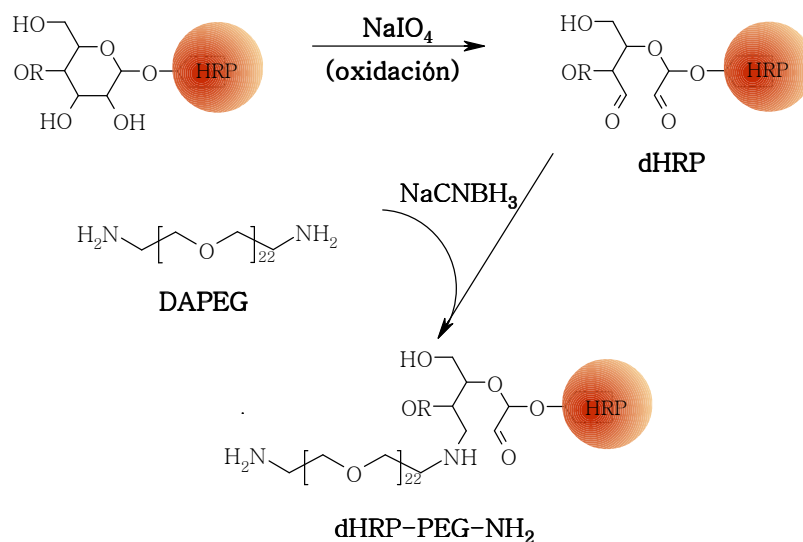


Figura 7.5: Pasos sintéticos involucrados en la modificación de HRP con DAPEG.

La conjugación de proteínas con polisacáridos empleando CDAP es una técnica bien conocida, comúnmente aplicada en la síntesis de vacunas [268–270]. También, en la mayoría de los casos, es una práctica habitual emplear una molécula espaciadora, como la hidracida del ácido adipico (ADH) [76], para unir la proteína con el

polisacárido. En nuestro caso, como molécula espaciadora, hemos empleado un diamino polietilenglicol de masa molecular 1000 (DAPEG). La introducción del espaciador a la enzima involucra una primera etapa de oxidación con periodato de sodio, dando lugar a la formación de grupos aldehído, seguida de una segunda etapa, donde uno de los grupos aminos del DAPEG reacciona con el carbonilo generando la amida correspondiente que tras su reducción con NaCNBH_3 da lugar al producto final dHRP-PEG-NH₂ (Figura 7.5).

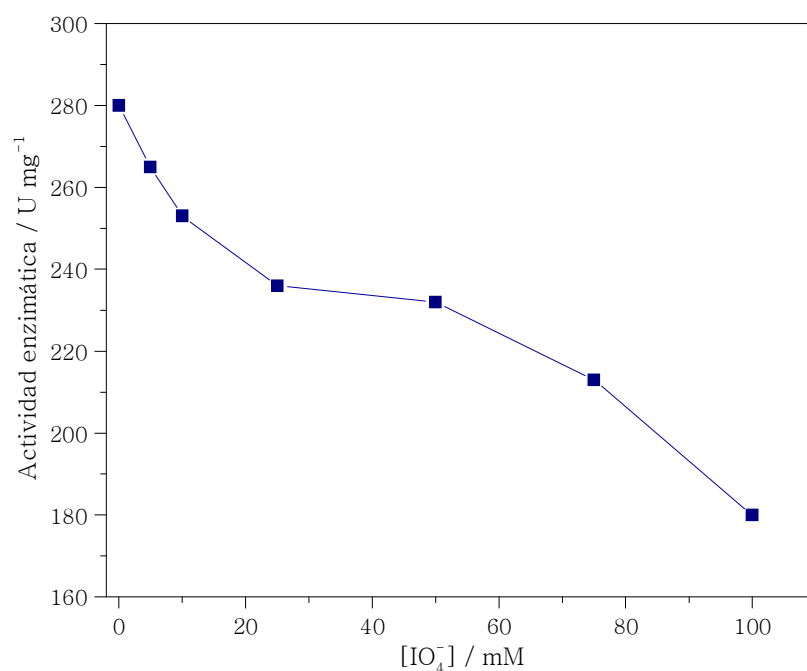


Figura 7.6: Efecto del tratamiento oxidativo sobre la actividad enzimática de dHRP.

El tratamiento con periodato de sodio sobre la HRP da lugar a la formación de grupos aldehídos. La eficiencia del tratamiento oxidativo y la incorporación del diamino polietilenglicol (Figura 7.5) aumenta con la concentración del periodato de sodio, sin embargo, también es responsable de la pérdida de actividad enzimática. El rol de la porción sacárida de la enzima ha sido investigado en varios trabajos científicos. Silva y colaboradores [32] han informado su rol esencial a nivel estructural de la enzima, asignando los sutiles cambios conformacionales a la remoción del polisacárido. Estos cambios conformacionales pueden llevar a una disminución de la protección frente a la proteólisis. Asimismo, han reportado que la proteína deglicosilada presenta una actividad enzimática significativamente menor respecto del valor correspondiente a la enzima nativa. Smith y colaboradores [274] obtuvieron una HRP deglicosilada por expresión heteróloga en *Escherichia Coli*, la cual presentaba el 50 % de la actividad

enzimática de la proteína glicosilada. Resultados similares se han obtenido para una isoenzima neutra de la peroxidasa de nabo (TP, *turnip peroxidase*) [275]. La actividad de TP se reduce al 50 % del valor de la enzima nativa después de la remoción enzimática del 32 % de la región oligosacárida.

Incluso si existen observaciones no del todo concluyentes respecto si la porción sacárida es esencial o no para la actividad de la peroxidasa, su remoción posee alguna influencia. En este punto, debemos tener en cuenta no solo el efecto de la remoción del oligosacárido de la enzima, sino el método empleado con este propósito. El tratamiento con periodato puede provocar la oxidación de aminoácidos [276]. Una característica común de las peroxidasas es la fuerte conservación de los aminoácidos en las regiones de los residuos de histidina a ambos lados de los sitios de unión del grupo hemo, el cual es esencial para la actividad enzimática. Este sitio puede afectarse durante el tratamiento con periodato, afectando la actividad de la enzima. Duarte-Vazquez y colaboradores [275] notaron que la oxidación de la región oligosacárida de peroxidasa de nabo con periodato (10 mM) produce su parcial remoción y la disminución de la actividad enzimática a 86 % y 15 % de la actividad de la proteína nativa, tras 1 y 20 horas de tratamiento, respectivamente.

El procedimiento oxidativo con periodato disminuye la actividad de peroxidasas por remoción de la cubierta protectora de carbohidrato y posible oxidación de aminoácidos, principalmente aquellos involucrados en la región de unión del sustrato. Por lo tanto, en la elección de las condiciones del tratamiento oxidativo debe establecerse un compromiso entre la eficiencia de la formación de grupos aldehídos y consecuente incorporación del DAPEG y la conservación de la actividad catalítica de la enzima. Para ello, se evaluó el proceso oxidativo para distintas concentraciones de periodato de sodio caracterizando cada una de las condiciones por la actividad biológica de la enzima y el cambio producido en su masa molecular tras ambos, su deglicosilación y la incorporación de la molécula espaciadora. En la Figura 7.6 puede observarse el efecto del proceso oxidativo sobre la actividad biológica de la enzima, generándose una disminución significativa incluso a bajas concentraciones de oxidante. Posterior a esta etapa, la HRP deglicosilada (dHRP) se separó cromatográficamente de los componentes de reacción y fue caracterizada por espectrometría MALDI-TOF y utilizada para su conjugación con la molécula espaciadora. Puede observarse en la Figura 7.7 el corrimiento de la señal correspondiente al ión $[M + H]^+$ de dHRP hacia valores de masas inferiores. Queda claro aquí que el tratamiento con periodato de sodio genera la pérdida de azúcares de la enzima, produciendo además una disminución en la capacidad

de la enzima para reducir el peróxido de hidrógeno. En la condición más severa, 100 mM de oxidante, el cambio en la masa de la enzima se corresponde con la pérdida de aproximadamente 8 hexosas.

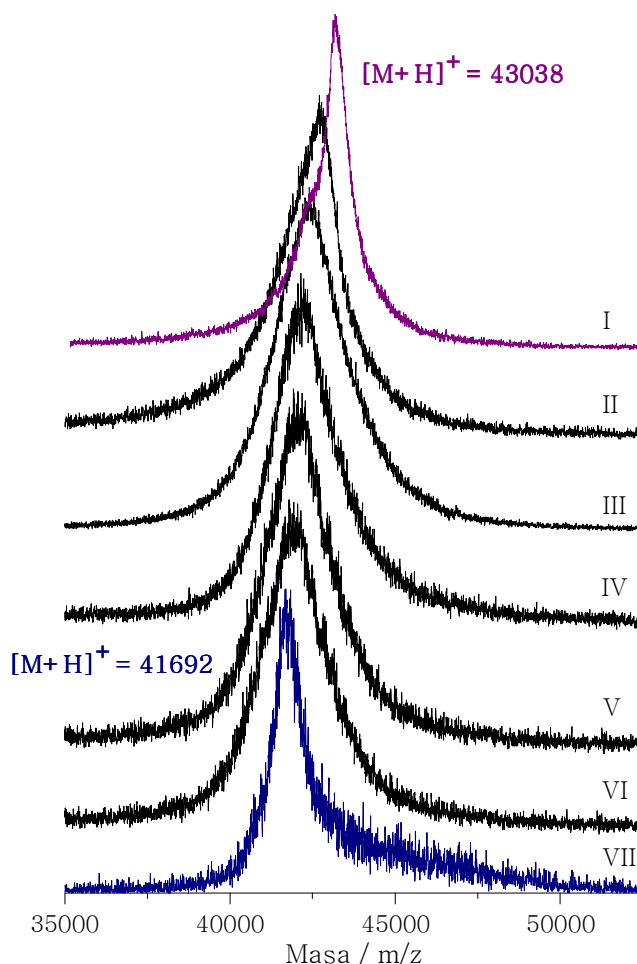


Figura 7.7: Espectrometría de masa MALDI en modo positivo de dHRP obtenida a diferentes concentraciones de periodato de sodio. De I a VII: 0; 5; 10; 25; 50; 75; 100 mM. La sección mostrada corresponde al ión $[M + H]^+$.

Tras el proceso oxidativo, la enzima deglicosilada se hizo reaccionar con un exceso de DAPEG. Finalizada la reacción, el exceso de espaciador que no reaccionó fue separado del derivado de la enzima por cromatografía de exclusión. El producto dHRP-PEG-NH₂ fue caracterizado por su actividad enzimática y por espectrometría MALDI-TOF. En la Figura 7.8 puede observarse el desplazamiento del pico correspondiente al ión $[M + H]^+$ de dHRP-PEG-NH₂, para distintas condiciones del tratamiento oxidativo, hacia valores de mayor masa. Esto pone en evidencia la incorporación de la molécula espaciadora a la enzima. Puede notarse también como la efectividad de la incorporación

del DAPEG aumenta más débilmente hacia mayores valores de concentración de periodato de sodio. En la Figura 7.9 este último hecho puede visualizarse más claramente. De aquí puede seleccionarse la condición más conveniente para llevar a cabo la modificación de la enzima con la menor pérdida de actividad biológica posible. A 25 mM de periodato de sodio se obtiene un corrimiento del pico del ión $[M + H]^+$ de 3686 unidades de masa, que corresponde a la incorporación, en promedio, de 3,7 moléculas de DAPEG. A mayores valores de periodato de sodio la adición de la molécula espaciadora no escala linealmente con la concentración, sin embargo el decaimiento de la actividad enzimática sí es notable. Por lo tanto, llevar a cabo el tratamiento oxidativo a 25 mM de periodato de sodio resulta ser una elección idónea.

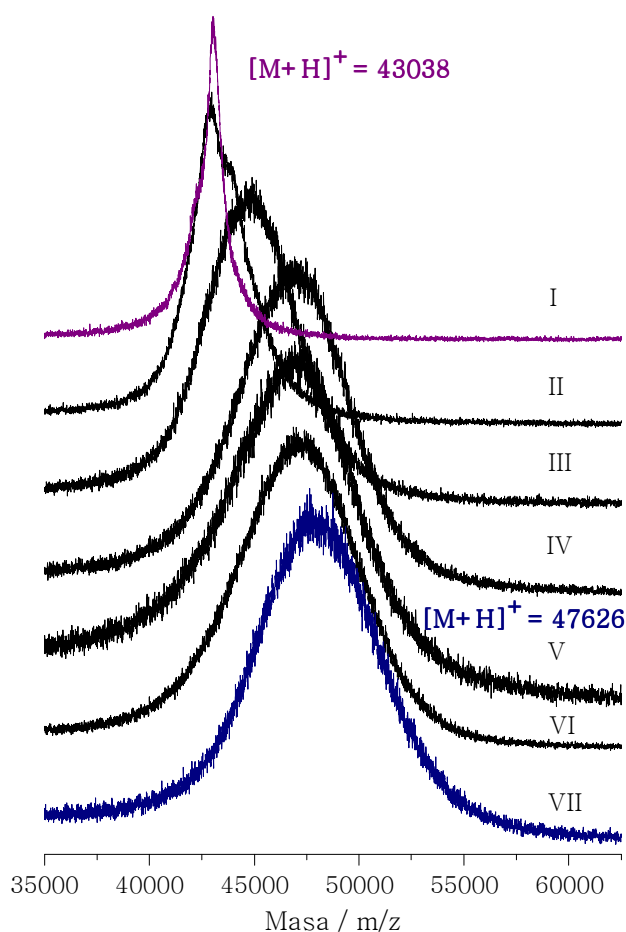


Figura 7.8: Espectrometría de masa MALDI en modo positivo de dHRP-PEG-NH₂ sintetizado luego de haber deglicosilado HRP en presencia de diferentes concentraciones de periodato de sodio. De I a VII: 0; 5; 10; 25; 50; 75; 100 mM. La sección mostrada corresponde al ión $[M + H]^+$.

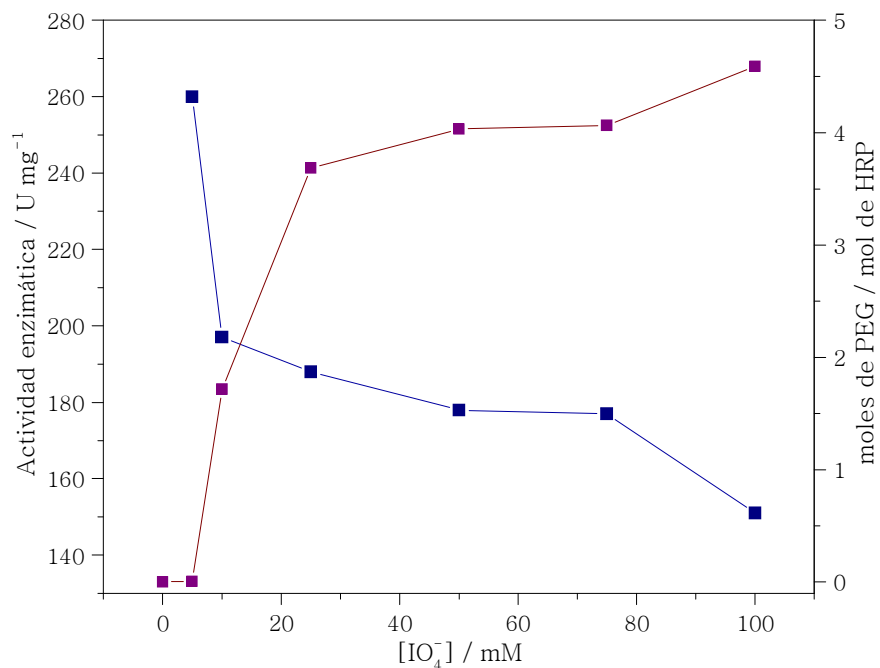


Figura 7.9: Efecto del tratamiento oxidativo sobre la actividad enzimática de dHRP-PEG-NH₂ (azul) y la incorporación de DAPEG (bordó).

Otro aspecto importante a tener en cuenta respecto a la incorporación del DAPEG a la enzima es la naturaleza química del extremo amino de la molécula espaciadora que reaccionará luego con el LPS activado. La reacción de conjugación del espaciador con la dHRP se llevó a cabo en condiciones donde se favorece su adición sólo por uno de sus extremos, dejando el restante grupo amino libre. Con el objetivo de evaluar la presencia de los grupos aminos primarios en los extremos del polietilenglicol, se implementó la siguiente estrategia: se hizo reaccionar ferrocenoaldehído con el derivado dHRP-PEG-NH₂ a través de la condensación del amino libre del polietilenglicol con el grupo aldehído del complejo en presencia de NaCNBH₃ (Figura 7.10). Luego, a partir de las medidas de voltametría diferencial de pulso puede conocerse la incorporación de ferroceno a la enzima que se corresponde con la cantidad de grupos aminos libres. Con esta información y conociendo la cantidad de moléculas espaciadoras unidas a la enzima provisto por el análisis por espectrometría MALDI-TOF, puede determinarse el número efectivo de polietilenglicoles unidos a dHRP que pueden reaccionar con el LPS.

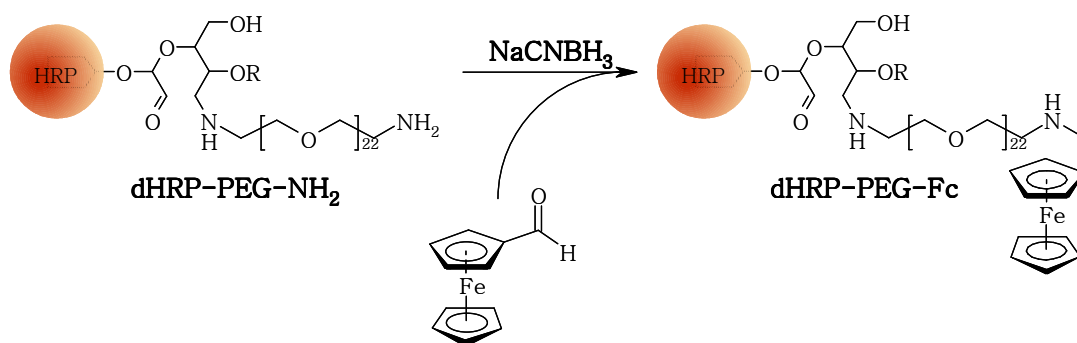


Figura 7.10: Esquema de la modificación de dHRP-PEG-NH₂ con ferrocenoaldehído.

La Tabla 7.2 resume los resultados obtenidos del análisis por voltametría diferencial de pulso. El modelo aplicado al análisis de la respuesta electroquímica está detallado en la sección 2.2.4. Para poder relacionar la corriente medida con la cantidad de ferroceno unido a la enzima es necesario conocer el coeficiente de difusión de la misma. Este valor puede estimarse, considerando a la HRP como una esfera y conociendo su radio, a partir de la ecuación de Stokes-Einstein [277]:

$$D_{HRP,H_2O}^{\infty} \approx \frac{kT}{6\pi\eta_{H_2O}r_{HRP}} \quad (7.1)$$

donde k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura en Kelvin, η_{H_2O} es la viscosidad del agua a la temperatura T (la solución diluida puede considerarse como si fuese agua) y r_{HRP} es el radio de la HRP. El coeficiente de difusión de la proteína a 25 °C, con $r_{HRP} = 32,8 \text{ Å}$ [278], es $6,6 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Muestra	[HRP] ¹ (μM)	[Fc] ² (μM)	[PEG] ³ (μM)
HRP-Fc	13	0	0
dHRP-PEG-Fc	13	20	48

¹ Espectrofotometría. ² Voltametría diferencial de pulso. ³ MALDI-TOF.

Tabla 7.2: Caracterización de dHRP-PEG-Fc y HRP-Fc por DPV.

En la Figura 7.11 se presenta la respuesta obtenida para el derivado dHRP-PEG-Fc y para una muestra de HRP modificada directamente con ferrocenoaldehído como blanco (HRP-Fc) (sección 7.2.4.3.1). Puede observarse que dHRP-PEG-Fc

presenta el perfil característico de la cupla Fc^0/Fc^+ ; mientras que la respuesta electroquímica de HRP-Fc es nula. Este último hecho puede deberse a la incorporación del ferroceno en la región hidrofóbica de la enzima impidiendo su acceso a la superficie del electrodo. Por otro lado, la incorporación de una molécula espaciadora a la proteína posibilita la exposición del ferroceno a la solución, facilitando la transferencia de electrones al electrodo.

Más allá del análisis cuantitativo que propicia la Figura 7.11, puede evidenciarse un corrimiento en el valor de E_p del ferroceno unido a la enzima respecto del correspondiente para el ferrocenoaldehído (Figura insertada). Al reaccionar con la enzima, el grupo carbonilo en el ferroceno se reduce, consecuentemente su potencial de oxidación se desplaza a valores más pequeños. De los valores presentados en la Tabla 7.2 pudo calcularse la relación dHRP:Fc, correspondiente a la incorporación de 1,5 moléculas de complejo por molécula de enzima. Teniendo en cuenta la estequiometría dHRP:PEG (1:3,7) y los resultados correspondientes a HRP-Fc, se extrae que el 40 % de los DAPEG unidos a la dHRP poseen sus extremos aminos libres para reaccionar con el LPS. En este punto debe considerarse que los resultados obtenidos representan una cota inferior, dado que se asume un rendimiento del 100 % para la reacción entre el grupo carbonilo del complejo y el grupo amino del DAPEG.

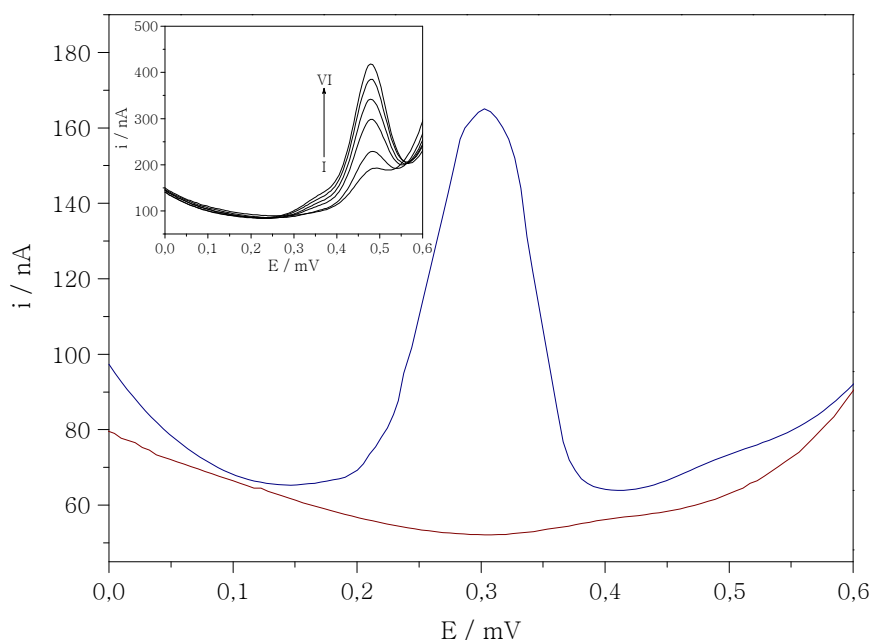


Figura 7.11: Voltametría diferencial de pulso de dHRP-PEG-Fc (azul) y HRP-Fc (bordó) según las especificaciones de la sección 7.2.4.3.2. Figura insertada: Respuesta de ferrocenoaldehído. De I a VI, 4 a 24 μM .

Adicionalmente, las proteínas o péptidos modificados con derivados del ferroceno u otros complejos electroactivos se utilizan frecuentemente como mediadores redox en mediciones electroquímicas, con particular enfoque en biosensores amperométricos [279–281]. Estos derivados representan un componente importante en la química molecular y supramolecular. El campo de aplicación de este tipo de derivados es muy amplio. Algunos ejemplos en esta área incluyen su uso como sondas bioelectrocatalíticas en ensayos amperométricos [282], dispositivos rectificadores de corriente [283], biosensores de ácidos nucleicos [284, 285], ensayos inmunológicos competitivos con detección electroquímica [286, 287], entre otros.

Finalmente, el derivado dHRP-PEG-NH₂, correspondiente a la oxidación a 25 mM de periodato de sodio, se hizo reaccionar con el LPS previamente activado con CDAP (Figura 7.12). Concluida la reacción, el producto se concentró y se desaló empleando buffer Tris 50 mM pH 6,5. De esta forma se separan los reactivos de baja masa molecular y se lleva el derivado de LPS al pH necesario para proseguir con la purificación por cromatografía de intercambio aniónico. La Figura 7.13 muestra el perfil de elución, donde claramente el derivado de la enzima sin reaccionar eluye primero, con prácticamente no interacción con la columna, y luego el conjugado LPS-PEG-HRP es eluido al incrementarse la fuerza iónica de la fase móvil. Como se ha introducido en el capítulo 6, a pH 6,5 la enzima posee carga positiva. Por otro lado, al unirse al LPS, los grupos fosfatos del lípido A le confieren al conjugado carga negativa resultando en su interacción con la columna, necesitándose aumentar la fuerza iónica para asegurar su elución.

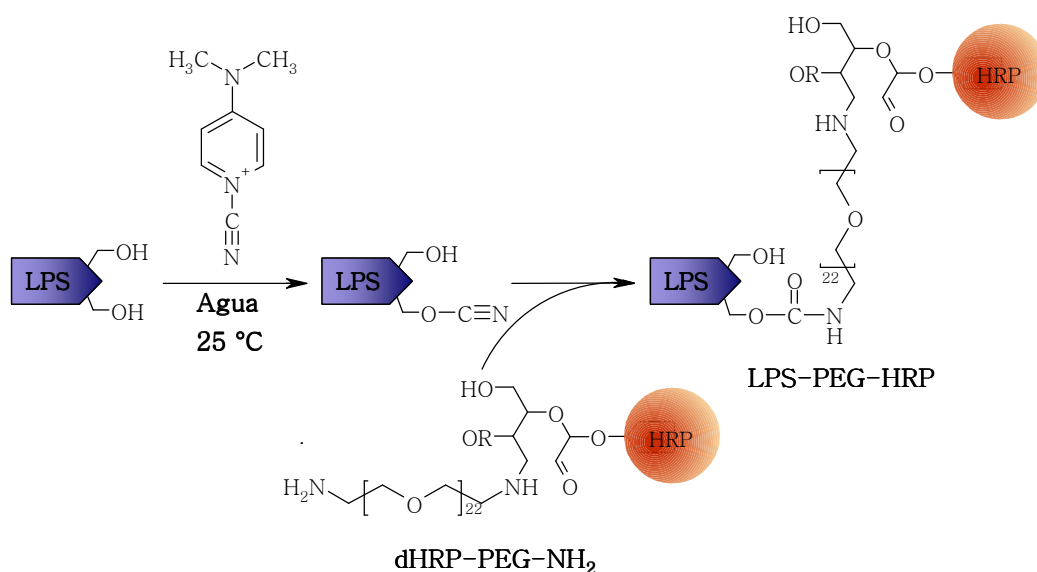


Figura 7.12: Pasos sintéticos involucrados en la conjugación de LPS con dHRP-PEG-NH₂.

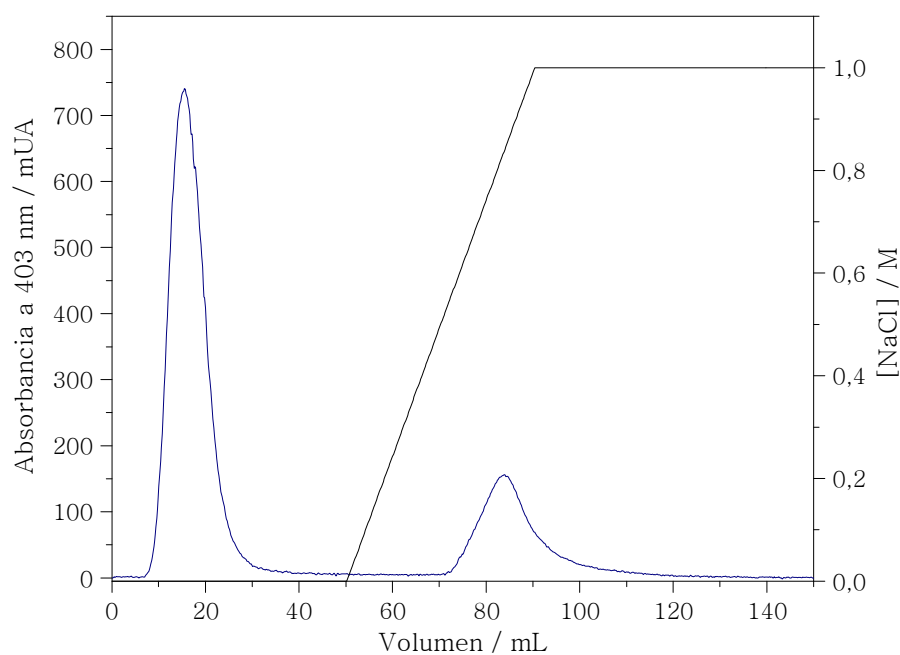


Figura 7.13: Cromatografía de intercambio aniónico para la separación de LPS-PEG-HRP de dHRP-PEG-NH₂ sin reaccionar (línea azul). El cambio en la concentración de NaCl está dado por la línea negra. Volumen de inyección: 3 mL.

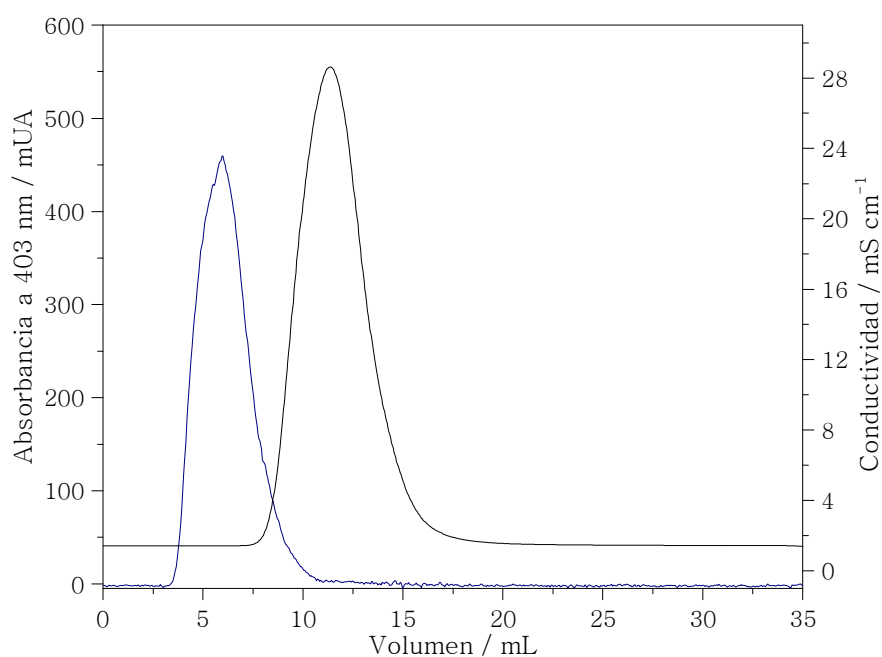


Figura 7.14: Perfil de elución para el desalado de LPS-PEG-HRP seguido por absorbancia a 403 nm (línea azul). Se emplearon dos columnas de desalado HiTrap en serie (5 mL de capacidad cada una). Volumen de inyección: 3 mL.

Las fracciones correspondientes al conjugado se agruparon, concentraron y luego se desalaron para eliminar el exceso de NaCl (Figura 7.14). El producto final se caracterizó por su contenido de Kdo (sección 3.2.2.2), proteína (sección 3.5.4), actividad enzimática (sección 3.5.3) y actividad pirógena (sección 3.2.2.2). Posteriormente, se lo suplementó con glicerol al 20 % v/v, etanol al 10 % v/v y se conservó a 4 °C en oscuridad hasta su utilización.

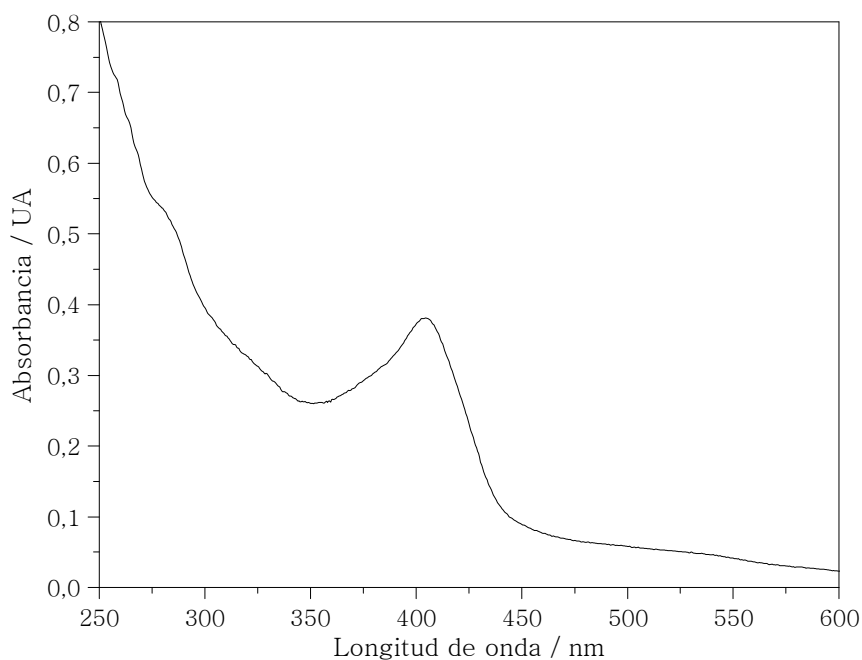


Figura 7.15: Espectro de absorción en agua MilliQ de LPS-PEG-HRP 400 µg mL⁻¹.

Muestra	[Proteínas] (Bradford) (µg mL ⁻¹)	[Proteínas] (Abs. 403 nm) (µg mL ⁻¹)	Conjugación (nmoles sonda por mg de polímero)	Act. Enzimática (U mg ⁻¹)	Act. Endotóxica (UE ng ⁻¹)
LPS-PEG-dHRP (400 µg mL ⁻¹)	225 ± 15		29 ± 4	98 ± 8	0,30 ± 0,05
		178 ± 4	21 ± 3	120 ± 10	0,30 ± 0,05

Tabla 7.3: Resultados de la caracterización del conjugado LPS-PEG-HRP.

En la Tabla 7.3 se resumen los resultados obtenidos correspondientes a la caracterización del LPS-PEG-HRP. Nótese la clara mejoría en la conservación de la actividad enzimática de la peroxidasa unida al LPS. Si bien siguen existiendo diferencias entre los valores de proteínas que se obtienen por el ensayo colorimétrico (Bradford) y

por la medida de absorbancia a 403 nm (Figura 7.15), esa diferencia es inferior a la que se obtiene para el conjugado sintetizado vía BrCN (capítulo 6). Este hecho y la actividad enzimática ponen en evidencia la eficacia de este procedimiento sintético respecto de la conservación de la enzima.

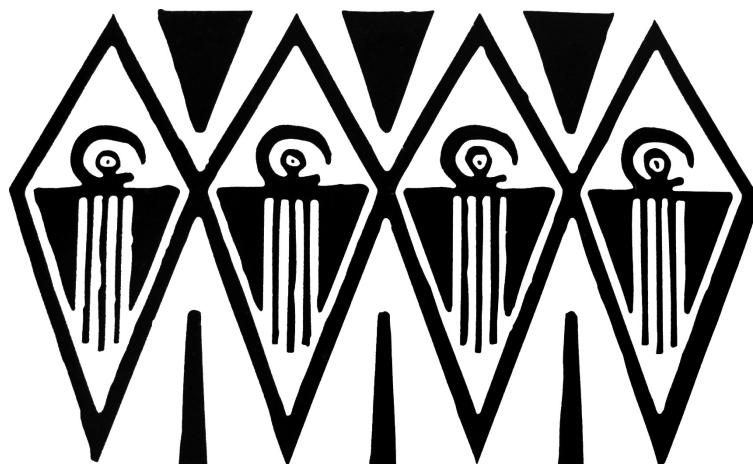
7.4 – Sumario

La síntesis de conjugados de lipopolisacárido empleando 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio como agente activante en medio acuoso demostró ser muy eficiente cuando se aplica una etapa de monomerización del LPS con tensioactivos previa a su activación. De los agentes anfifílicos ensayados, el NaDC fue el que dio lugar a la síntesis de derivados con mayor relación de conjugación. Mediante la aplicación de esta estrategia sintética pudieron obtenerse conjugados de LPS con un fluoróforo, hidracina de dansilo y con una enzima, peroxidasa de rábano picante. En forma similar a lo descrito en el capítulo 6, el rendimiento de conjugación resultó ser satisfactorio obteniéndose una incorporación de 110 nmoles de dansilo y 29 nmoles de HRP por mg de LPS manteniendo un 70 y 60 % de la actividad pirógena respectivamente. El punto sobresaliente respecto a la modificación con bromuro de cianógeno es la conservación de la actividad enzimática de la peroxidasa.

En el capítulo 8 se presentan resultados de este derivado LPS-PEG-HRP, en el desarrollo de un ensayo competitivo amperométrico para la detección de LPS.

Capítulo
8

Ensayo Competitivo



8.1 – Introducción

En este capítulo se describe la implementación del LPS-PEG-HRP, sintetizado de acuerdo a lo especificado en el capítulo 7, en el desarrollo de un ensayo competitivo amperométrico para la detección de endotoxinas. Como plataforma transductora se utilizó un arreglo de 8 electrodos de $0,6 \text{ cm}^2$ de área geométrica cada uno. La construcción de este dispositivo involucra la combinación de técnicas serigráficas y de electrodeposición de oro. Este sistema empleado en conjunto con un multipotenciostato permite el análisis simultáneo de 8 muestras independientes por ensayo, favoreciendo la reproducibilidad y rapidez del mismo.

En la ejecución del ensayo competitivo se utilizan electrodos de oro modificados covalentemente con el agente de reconocimiento ENP (Endotoxin Neutralizing Protein). Esta proteína se inmoviliza sobre el electrodo a través de su unión a una matriz de carboximetildextrán, también covalentemente unida a la superficie de oro. Como se ha introducido en el capítulo 4, la matriz de dextrano es capaz de disminuir la adsorción inespecífica de una proteína hidrofóbica como la neutravidina favoreciendo la relación señal específica/señal inespecífica. Considerando la naturaleza hidrofóbica del lípido A, se aplica este mismo concepto en vista de minimizar la adsorción inespecífica del LPS.

En el proceso de construcción de los electrodos modificados, el oro se funcionalizó con cistamina de modo de proveer a la superficie grupos aminos. Posteriormente, la incorporación del carboximetildextrán procede a través de la formación de un enlace amida entre los grupos carboxílicos del polímero y los aminos en la superficie del electrodo según se ha descrito en 4.2.2. Finalmente, la misma reacción, previa activación de los grupos carboxílicos del carboximetildextrán, permite la incorporación de la proteína de reconocimiento. En la Figura 8.2 se representa un esquema de las modificaciones mencionadas.

La incorporación del alcanotiol puede evaluarse por desorción reductiva a pH básico, según lo descrito por Walczak y colaboradores [234] como ha sido realizado en el capítulo 4, sección 4.2.4.1. Otra forma de evaluar el cubrimiento del tiol es por modificación de los electrodos Au/Cys con ferrocenocarboxialdehído. Para un rendimiento de reacción del 100 %, la cantidad de moles de ferroceno incorporados es equivalente a la cantidad de cistamina sobre el electrodo. Con este mismo método puede estimarse, de forma indirecta la cantidad de carboximetildextrán unida a la cistamina. En este caso electrodos Au/Cys/CMDex son modificados con ferrocenocarboxialdehído, por lo tanto, el cubrimiento de ferroceno proporciona por

diferencia con el que se obtiene para Au/Cys, la cantidad de polímero unido al electrodo. En el capítulo 4 se ha introducido el uso de la elipsometría para evaluar la incorporación del carboximetildextrán a la superficie del electrodo. Un tratamiento similar se ha aplicado para determinar el grado de modificación del oligosacárido con la proteína de reconocimiento, ENP. Esos estudios han sido detallados en la tesis doctoral de la Dra. Priano [122] y publicados parcialmente en [148].

Otra forma de evaluar las distintas etapas de la modificación de los electrodos es por espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS). Por esta técnica, evaluando las regiones N 1s y C 1s de los espectros obtenidos, pudo monitorearse la incorporación de los distintos componentes de los electrodos modificados.

Habiéndose construido la plataforma de análisis se estudió su comportamiento frente a la adsorción inespecífica del LPS y en el desarrollo de un ensayo competitivo empleando LPS-PEG-HRP y una fracción purificada de LPS de *Salmonella Minnesota*. En este ensayo, la molécula de ENP inmovilizada en el electrodo interactúa específicamente tanto con el lipopolisacárido presente en la muestra, como con el LPS conjugado. Los electrodos se incuban con concentraciones variables de LPS y concentración fija del conjugado para dar lugar a la competencia por los sitios en la superficie modificada. La corriente catalítica generada a través de la enzima HRP en el conjugado, será directamente proporcional a la cantidad de LPS-PEG-HRP incorporado al electrodo. La respuesta a distintas concentraciones de LPS está representada por la curva de calibración o curva de dosis-respuesta. Para altas concentraciones de LPS, se espera que una cantidad nula o muy pequeña de LPS conjugado se una a los sitios de ENP, generando en consecuencia una caída de la señal a cero. Por otro lado, para concentraciones bajas de LPS, una gran cantidad de LPS conjugado estará unido a los sitios de ENP resultando en una señal máxima. Por lo tanto, la cantidad de LPS conjugado unido, y así mismo la señal amperométrica, tendrán una dependencia inversamente proporcional con la concentración de LPS en la muestra. A partir de este tipo de respuesta, el LPS puede ser cuantificado por su capacidad de inhibir la unión del conjugado al ENP inmovilizado en la plataforma transductora.

Los principales factores que determinan las características del ensayo, su sensibilidad y su límite de detección, son: la afinidad del LPS y el LPS conjugado hacia el agente de reconocimiento, el número de sitios específicos y el nivel de unión específica. Para obtener una máxima sensibilidad, la cantidad de sitios específicos debe disminuirse tanto como sea posible, la cantidad de conjugado utilizada debe ser cercana pero menor a la concentración de saturación y la unión inespecífica debe ser mínima.

Para la determinación de la concentración óptima de conjugado, una técnica muy utilizada en el diseño de inmunoensayos competitivos es la construcción de lo que se llama un “tablero de titulación” [288]. El tablero se construye a partir de experimentos de adsorción del conjugado a distintas concentraciones de la molécula de reconocimiento, pudiéndose también variar la concentración de conjugado.

Una vez definidas las condiciones, se llevó a cabo el ensayo competitivo. A tal efecto, los electrodos fueron expuestos a soluciones de concentración fija de conjugado y concentración variable de LPS, y la respuesta, la corriente catalítica dada por la enzima HRP, en presencia de su sustrato, fue graficada en función de la concentración de LPS, obteniéndose la curva de calibración.

8.2 – Experimental

8.2.1 – Reactivos

rENP (versión recombinante de LALF) proveniente de *Saccharomyces Cerevisiae* fue provista y caracterizada por Seikagaku America de Associates of Cape Cod, Inc. (pI 8.5, Mr = 12.2 kDa, 105 residuos aminoácidos y 90% de pureza, lote: 9-054). Carboximetildextrán70 (CMDex70) fue sintetizado de acuerdo a lo detallado en la sección 3.3. El mediador redox soluble $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{py})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (bpy: bipyridina, py: piridina) fue sintetizado en nuestro laboratorio como ha sido previamente informado [226].

8.2.2 – Construcción de electrodos modificados

El detalle experimental de la construcción de los electrodos modificados se describió en el capítulo 4, en la sección 4.2.2. El mismo procedimiento se implementó tanto para las láminas planas de oro como para las placas multielectrodos.

Aquellos electrodos Au/Cys/CMDex destinados a una modificación subsiguiente con ENP, se enjuagaron primero con buffer PIPES 100 mM pH 7,4 con NaCl 150 mM y luego con buffer MES 50 mM pH 5,5.

8.2.2.1 – Modificación con la proteína de reconocimiento ENP (Au/Cys/CMDex/ENP)

La unión de ENP a los electrodos modificados con carboximetildextrán (Au/Cys/CMDex) se realizó con un procedimiento similar al empleado para la construcción de Au/Cys/CMDex. El agente de reconocimiento se une al carboximetildextrán a través de la activación de los grupos carboxílicos empleando EDC y NHS y posterior conjugación de ENP formando un enlace amida (Figura 8.2). Los electrodos se sumergieron en buffer MES 50 mM pH 5,5 conteniendo EDC 100 mM y NHS 125 mM, con agitación durante 30 minutos de modo de activar los grupos carboxílicos presentes en el CMDex. Luego, se enjuagaron con buffer MES 50 mM pH 5,5 y se sumergieron en una solución de ENP 1 μ M en buffer HEPES 50 mM pH 8,0, a menos que se indique otra concentración. La reacción se dejó proseguir durante 2 hora a 22 °C y agitación. Luego, los electrodos modificados se sumergieron en una solución de etanolamina 1 M para bloquear los grupos carboxílicos activados que no hayan reaccionado. Finalmente, los electrodos se enjuagaron con buffer HEPES 50 mM pH 8,0 y luego con agua milliQ.

8.2.3 – Análisis de los electrodos modificados por espectroscopía fotoelectrónica de rayos X

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS, X-ray photoelectron spectroscopy) se basa en el efecto fotoeléctrico. Básicamente, un fotón de alta energía impacta sobre un electrón de un nivel electrónico interno de un átomo, produciendo su eyección. La energía cinética, E_k , del electrón emitido (fotoelectrón), que depende de la energía del fotón incidente, $h\nu$, se mide en un espectrómetro de electrones. La energía de unión del electrón, E_B , se puede calcular mediante la siguiente ecuación:

$$E_k = h\nu - E_B - w \quad (8.1)$$

En esta ecuación, w es la función de trabajo del espectrómetro, un factor corrector del entorno electrostático en el cual el electrón se forma y se mide. La energía de unión de un electrón es característica del átomo y del orbital en el que se encontraba el electrón que se ha emitido, dependiendo además del entorno químico del elemento. De esta forma, los espectros de XPS proporcionan información cualitativa sobre los tipos de átomos presentes en un compuesto, el número relativo de cada uno y su entorno químico.

Es importante señalar que los fotoelectrones producidos en XPS son incapaces de pasar a través de más de 10 a 50 Å de un sólido. Por lo tanto, la aplicación más importante de la espectroscopía de electrones es la obtención de información sobre las superficies. En XPS se trabaja con rayos X blandos (1keV) lo que la convierte en una técnica no destructiva, aplicable a materiales orgánicos, biológicos e inorgánicos. Una descripción más detallada de la técnica y el instrumental utilizado puede encontrarse en [274, 289].

Las mediciones de XPS que se presentan en este capítulo se realizaron en el Laboratorio de Nanoscopias y Técnicas de Superficie (INIFTA) dirigido por el Dr. Salvarezza, y estuvieron a cargo de los Dres. Benitez y Rubert. El espectrómetro consta de una fuente de Mg K α (XR50, Specs GmbH) y un analizador hemisférico (PHOIBOS 100, Specs GmbH). La energía de los fotones incidentes es de 1253 eV. Se realizó una calibración de la escala de energía de dos puntos utilizando oro evaporado (energía de enlace de Au 4f_{7/2} = 84,00 eV) y cobre (energía de enlace de Cu 2p_{3/2} = 933,67 eV).

8.2.4 – Adsorción de LPS-PEG-HRP

La adsorción de LPS-PEG-HRP se llevó a cabo sumergiendo los electrodos en solución de conjugado 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en buffer apirógeno Tris 50 mM pH 7,4 con NaCl 100 mM, durante 1 hora a 22 °C con agitación orbital suave. Posteriormente, los electrodos se enjuagaron con buffer apirógeno y luego con agua apirógena. En las mismas condiciones se realizó un experimento blanco empleando HRP 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Actividad 280 U mg^{-1}).

8.2.5 – Ensayo competitivo

El ensayo competitivo se llevó a cabo por adsorción de una mezcla de LPS fracción 9-10 (Actividad endotóxica 1,2 UE ng^{-1}) (previamente sonificado) de concentración variable y LPS-PEG-HRP a una concentración fijada en 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en buffer apirógeno Tris 20 mM pH 7,4 con NaCl 100 mM, durante 1 hora a 22 °C con agitación orbital suave. Finalizado el proceso de adsorción, los electrodos se enjuagaron con buffer apirógeno y luego con agua apirógena. La corriente informada para cada concentración corresponde al promedio de al menos dos electrodos.

8.2.6 – Mediciones cronoamperométricas

Las medidas cronoamperométricas se realizaron manteniendo el potencial del electrodo de trabajo fijo a 50 mV vs. Ag/AgCl. Los electrodos funcionalizados se midieron inmediatamente luego de su preparación. Para todos los ensayos descriptos, los electrodos se enjuagaron y se introdujeron en la celda electroquímica conteniendo buffer Tris 50 mM pH 7,5, KNO_3 0,2 M. El mediador redox $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCl}]\text{PF}_6$ se utilizó a una concentración de 20 μM . Los electrodos modificados fueron conectados al potenciostato (ver Figura 2.14 pág. 57), dejando equilibrar con la solución; las corrientes de fondo fueron siempre menores que 10 nA. Luego, se agregó peróxido de hidrógeno a una concentración final de 0,9 mM; inmediatamente un cambio en el valor de la corriente fue observado, que alcanzó un valor constante, debido a la corriente catalítica catódica producida, la cual fue proporcional a la concentración superficial de LPS-PEG-HRP. La Figura 8.1 ilustra el tipo de señal que se obtiene en este tipo de mediciones. Para los electrodos modificados con carboximetildextrán, las señales obtenidas fueron normalizadas por el área geométrica, dado que para experimentos que involucran especies electroquímicas en solución, y tiempos del orden de los minutos, el factor de rugosidad no tiene efecto [227].

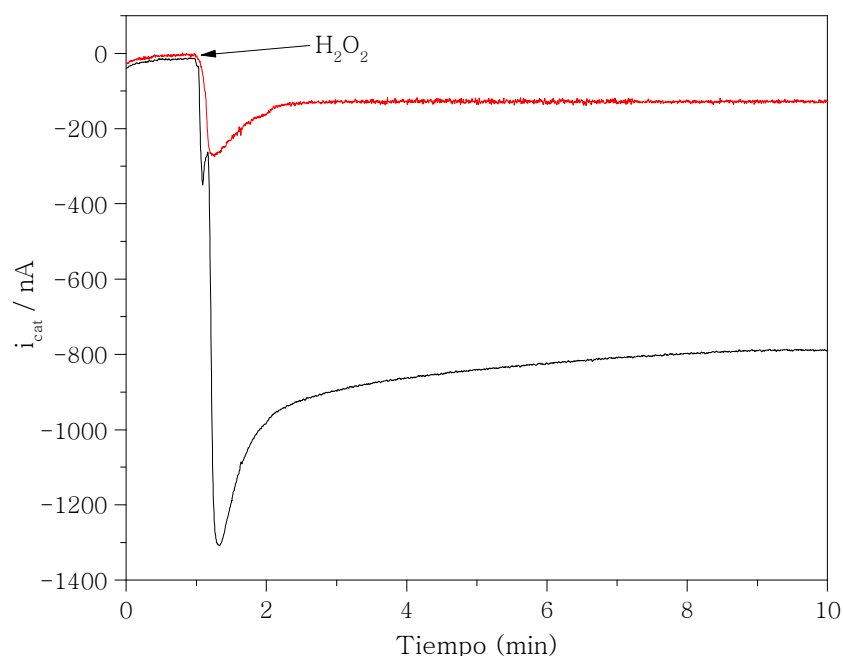


Figura 8.1: Cronoamperometría para la adsorción de LPS-PEG-HRP sobre Au (línea negra) y sobre Au/Cys/CMDex70 (línea roja). Se indica el momento del agregado de H_2O_2 .

8.3 – Resultados

8.3.1 – Seguimiento de la construcción de los electrodos modificados

La construcción de los electrodos modificados procede en primera instancia por la incorporación del reactivo bifuncional, la cistamina, la cual da lugar a la adsorción de 2 aminoetanotioles sobre la superficie de oro. Posteriormente, se incorpora el carboximetildextrán a través de la formación de un enlace amida entre los grupos aminos en la superficie del electrodo y los grupos carboxílicos del CMDex. Finalmente, mediante la misma reacción, se funcionaliza la superficie con la proteína de reconocimiento, ENP, reaccionando los grupos aminos de la proteína con los grupos carboxílicos del polisacárido (Figura 8.2).

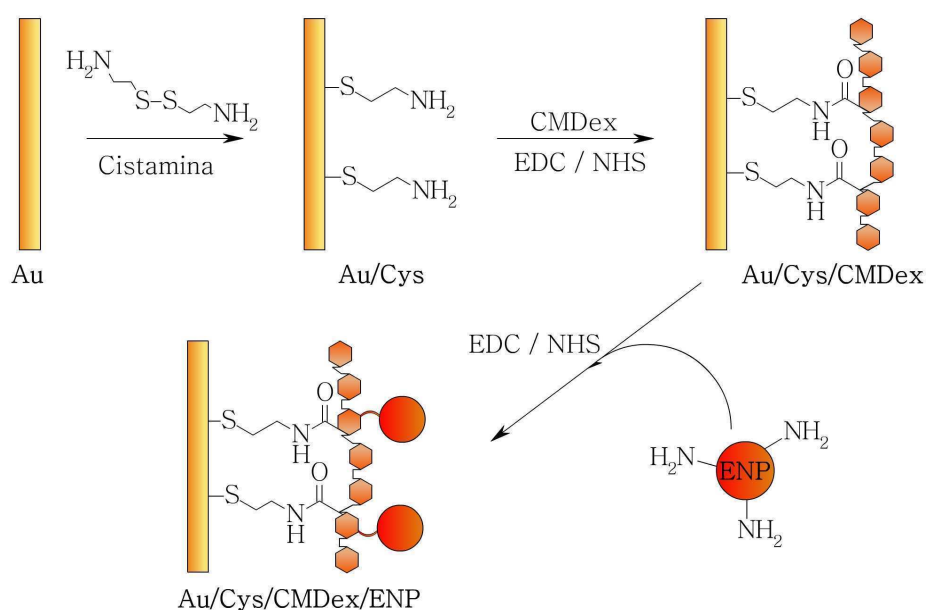


Figura 8.2: Construcción de electrodos modificados empleados en el desarrollo del ensayo competitivo. El CMDex es inmovilizado a la superficie de oro a través de la formación de un enlace amida, luego ENP es incorporado mediante la misma reacción.

Como ya se ha introducido en el capítulo 4, la modificación de la superficie de oro con cistamina pudo evaluarse mediante la desorción electroquímica en medio básico rindiendo un cubrimiento completo de la superficie, $(5,7 \pm 0,3) \times 10^{-10} \text{ moles cm}^{-2}$. Por otro lado, de las medidas elipsométricas de electrodos modificados con el polisacárido se pudo concluir que el CMDex70 se encuentra inmovilizado como una película densamente empacada con una concentración superficial de $51 \text{ pmoles cm}^{-2}$.

Una alternativa para evaluar la incorporación de cada uno de los elementos que componen a los electrodos modificados es la espectroscopía fotoelectrónica de rayos X. Los electrodos modificados, Au/Cys, Au/Cys/CMDex y Au/Cys/CMDex/ENP, construidos de acuerdo a lo descrito en la sección experimental, se analizaron en las regiones del espectro correspondientes al Au 4f, S 2p, N 1s y C 1s correspondientes al sustrato y a los componentes principales de los adsorbatos. En la Figura 8.3 se presenta el espectro de XPS correspondiente a la región Au 4f para las tres etapas de la modificación de los electrodos. Obsérvese como disminuye la intensidad de la señal a medida que se avanza en las distintas etapas de la construcción de los electrodos. Este comportamiento es consecuencia del aumento del espesor del sustrato depositado sobre la superficie del oro, dado que la intensidad de los electrones de una dada energía cinética decae como una función de la distancia dentro del sólido [274, 289]. Si bien, estos espectros no proveen información respecto de la naturaleza química de los adsorbatos, se pone en evidencia la incorporación de material al electrodo.

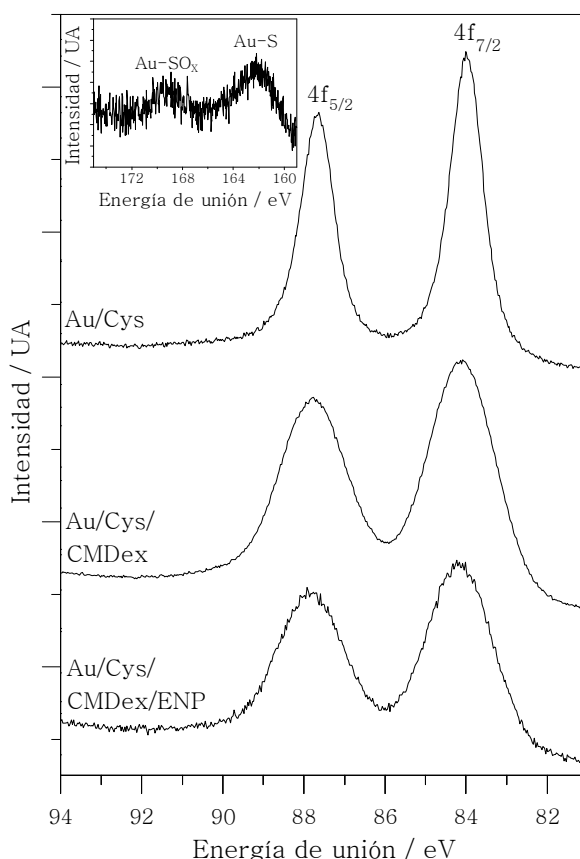


Figura 8.3: Espectros de XPS de la región Au 4f de los electrodos modificados Au/Cys, Au/Cys/CMDex y Au/Cys/CMDex/ENP. Figura insertada: Evidencia de la adsorción de cistamina. Espectro XPS de la región S 2p de Au/Cys.

Para obtener información de la naturaleza química de los adsorbatos incorporados a la superficie de oro, se realizaron espectros de XPS de las regiones N 1s y C 1s de los distintos electrodos modificados. En la Figura 8.4 se presentan los espectros obtenidos con sus respectivas deconvoluciones, para los tres sistemas bajo estudio.

Analizando los corrimientos químicos presentes en la señal de N1s (Figura 8.4 A) se observan dos componentes principales en todos los espectros, una señal a 401,5 eV asignable a grupos aminos protonados [290–292] o aminos que presentan enlaces de tipo puente hidrógeno [291]. y otra señal a 400,1 eV consistente con grupos aminos primarios libres [290–293]. Esta última señal se encuentra muy próxima al corrimiento químico de nitrógeno de grupos amidas, que suele observarse a 0,3 eV por encima [291]. Observando el espectro de Au/Cys se evidencian las señales correspondientes al grupo amino libre y al amino protonado del alcanotiol. En este y en los espectros sucesivos, a valores bajos de energía se observa una tercera señal que no se corresponde con la estructura química de la cistamina, pudiendo deberse a alguna impureza proveniente del reactivo o bien a algún producto de reacción de la cistamina. La energía a la cual se observa este pico es consistente con la señal que se observa para grupos iminas ($=N^+ <$) [290, 293].

La incorporación del carboximetildextrán se evidencia en el espectro de Au/Cys/CMDex por un aumento en la señal a 401,5 eV respecto de la señal a 400,1 eV. Este cambio en las intensidades relativas de los picos puede entenderse por la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos aminos que provee la cistamina a la superficie y los grupos carbonilos del polisacárido. La señal de amida que se espera observar producto de la reacción del CMDex con la cistamina no puede distinguirse de la propia señal de los aminos libres.

En el caso del espectro de Au/Cys/CMDex/ENP se invierte la relación de señales observada en la etapa anterior de la modificación (Au/Cys/CMDex). La otra particularidad del espectro es que su máximo se desplaza a valores de mayor energía (400,4 eV). Estas observaciones son consistentes con un gran aumento de la concentración superficial de grupos amida como consecuencia de la inmovilización de la proteína.

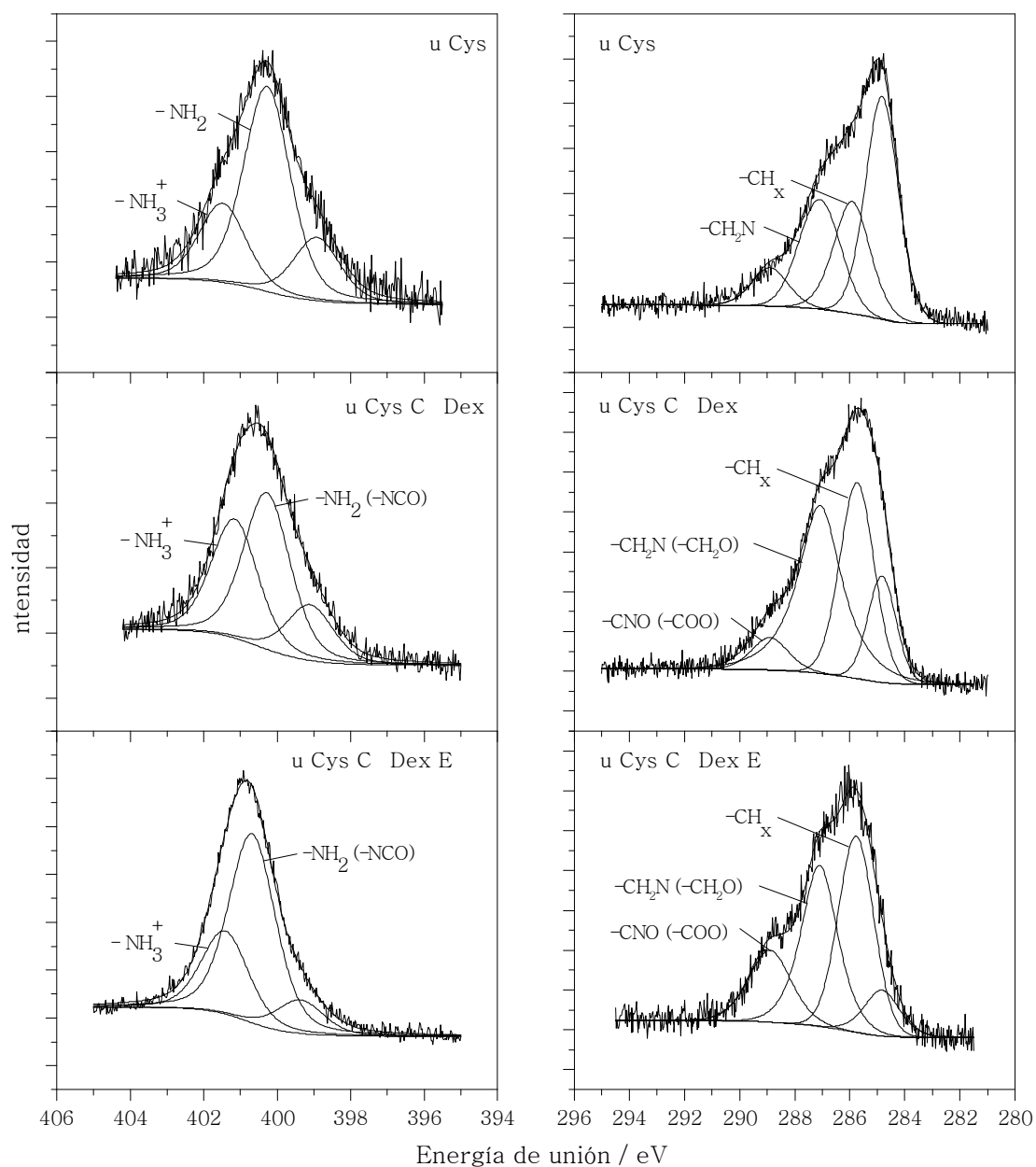


Figura 8.4 Espectros de $C 1s$ de electrodos modificados u Cys, u Cys C Dex y u Cys C Dex E.

Los espectros de $C 1s$ de los tres electrodos modificados en la figura 8.4 complementan y respaldan la información adquirida de los espectros de la $N 1s$. En el espectro de u Cys se observan las señales típicas de C de metileno C_{1s} y de carbono unido a nitrógeno de amina C_{2s} a un corrimiento de 28.8 y 28.0 eV respectivamente (291-293). En este mismo espectro y también en los espectros siguientes aun que en menor intensidad se observa una señal a 28.0 eV que no se condice con la estructura química de la cistamina. Esta señal también se

ha observado para oro sin modificar y puede asignarse a residuos carbonosos propios del metal [291, 292]. Por otro lado, a 289,0 eV se observa una señal de baja intensidad atribuible a la formación de carbamatos como resultado de la reacción entre el dióxido de carbono y los grupos aminos de la cistamina [294–296]. A corrimientos químicos cercanos a este pico suelen observarse las señales correspondientes a grupos amidas ($\text{O}=\text{C}-\text{N}$), carboxílicos ($\text{O}=\text{C}-\text{O}$) y carbonilos ($\text{C}=\text{O}$) [291, 293]. En el espectro correspondiente al electrodo Au/Cys/CMDex se observa un aumento relativo de las señales de metilenos (285.8 eV) y alcoholes o alcóxidos (287,0 eV), consistente con la adsorción del polisacárido. La incorporación de la proteína a la superficie del electrodo se evidencia por un aumento significativo de la señal a 289,0 eV característico de grupos amidas.

8.3.2 – Adsorción de LPS-PEG-HRP

En el ensayo presentado en este capítulo, se eligió ENP como elemento de reconocimiento. La elección se basa en algunas características importantes, es una proteína que se une y neutraliza a LPS proveniente de diferentes cepas bacterianas Gram-negativas tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro* [41, 105, 297], existe como una proteína recombinante de *S. Cerevisiae*, y es altamente estable. El polvo liofilizado puede ser almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ prácticamente por tiempo indefinido, y una solución acuosa puede guardarse a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 mes o congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por varios meses. El otro componente clave de este ensayo es el conjugado LPS-PEG-HRP (capítulo 7), el elemento responsable de generar la señal.

En un ensayo competitivo balanceado, el conjugado de LPS debe poseer una actividad endotóxica apropiada y buena relación de conjugación. Por lo tanto, la síntesis de este derivado de HRP debe satisfacer esas características. Por otro lado, los electrodos modificados deben proporcionar una respuesta específica, mediada en este caso por ENP, que sea significativa, y deben minimizar la señal correspondiente a la adsorción inespecífica. De esta forma, se busca optimizar el diseño de la plataforma de medición de modo de obtener una buena relación señal específica/señal inespecífica.

En el capítulo 4 se ha discutido el uso de distintos polímeros hidrofílicos para disminuir la adsorción inespecífica de una proteína hidrofóbica modelo como es la neutravidina. Muy buenos resultados se han obtenido modificando la superficie de electrodos de oro con carboximetildextranos y polietilenglicoles. En particular, el CMDex70 proporcionó una plataforma muy útil, dado que su uso disminuye la adsorción

inespecífica de la proteína en un orden de magnitud respecto a oro sin modificar. Además, entre las bondades que presenta la construcción de electrodos modificados con CMDex70 podemos citar su capacidad de formar una capa densa en la cual el mediador redox mantiene su comportamiento reversible, así como la posibilidad de unir moléculas de reconocimiento a través de los grupos carboxílicos usando un simple paso de reacción. El comportamiento de esta plataforma se estudió respecto a la adsorción inespecífica del LPS. Para ello, arreglos de multielectrodos fueron modificados con carboximetildextrán70 y se llevaron a cabo ensayos de adsorción similares a los descritos en el capítulo 4. En este caso, el uso del conjugado LPS-PEG-HRP proporciona, midiendo la corriente catalítica en presencia de agua oxigenada y un mediador redox, una medida de la concentración superficial de LPS adsorbido sobre el electrodo. La Figura 8.5 muestra el comportamiento de la plataforma seleccionada para el ensayo competitivo.

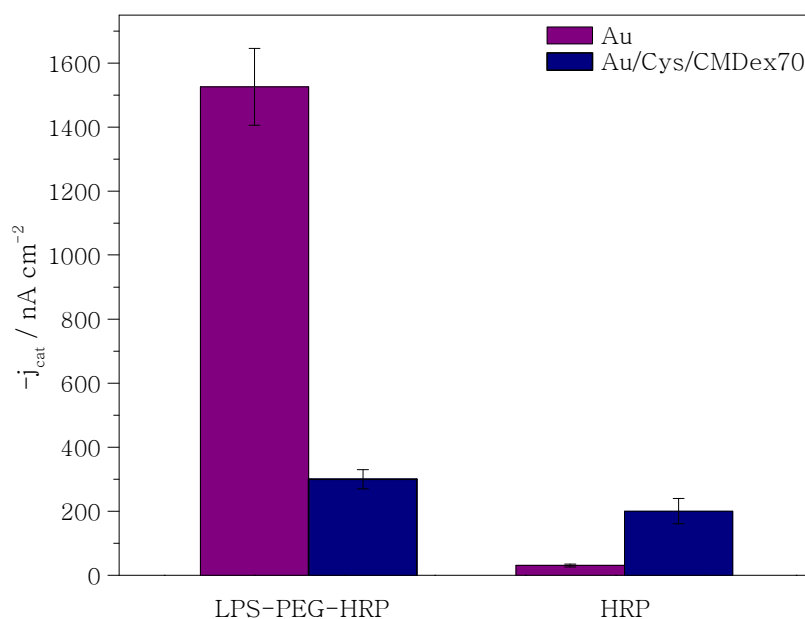


Figura 8.5: Corriente catalítica debido a la adsorción inespecífica de LPS-PEG-HRP y HRP sobre distintos electrodos. $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCl}]\text{PF}_6 = 20 \mu\text{M}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,9 \text{ mM}$.

La plataforma seleccionada (Au/Cys/CMDex70) para realizar el ensayo competitivo muestra un comportamiento efectivo, reduciendo la adsorción inespecífica del conjugado LPS-PEG-HRP en 5 veces respecto a electrodos de oro sin modificar. Esta misma superficie se evaluó respecto de la adsorción de HRP rindiendo valores de

corriente catalítica pequeños, evidenciando que la eventual adsorción inespecífica de HRP libre es despreciable. En estos ensayos de adsorción inespecífica, la concentración de mediador y peróxido de hidrógeno permanecen constantes. En el análisis de los resultados, debe considerarse que la actividad de la enzima sin modificar es aproximadamente 3 veces mayor que la correspondiente para la enzima conjugada con el LPS. Por lo tanto, a una misma concentración superficial de HRP, la corriente catalítica proporcionada por la enzima sin modificar sería 3 veces mayor que la correspondiente para la enzima modificada con LPS. Esta observación fortalece el hecho de que la superficie modificada con CMDex70 se comporta satisfactoriamente respecto de la adsorción inespecífica de tanto, el LPS-PEG-HRP, como la HRP. En particular se observa una mayor adsorción de la enzima sobre los electrodos modificados con el carboximetildextrán respecto a oro limpio. Este comportamiento podría asignarse a una interacción de tipo electrostática considerando la carga negativa del CMDex y la carga positiva de la proteína (pI 9) al pH de la adsorción (pH 7,4). De todos modos, al margen de la mayor actividad de la HRP nativa, las cifras de corriente que se obtienen para su adsorción son significativamente inferiores a las corrientes obtenidas para el conjugado LPS-PEG-HRP, denotando que la superficie de oro modificada con carboximetildextrán es una buena elección para el desarrollo de un ensayo de reconocimiento molecular en las condiciones descriptas.

La respuesta específica del electrodo pudo evaluarse incorporando el agente de reconocimiento. La Figura 8.6 muestra el resultado de un experimento en el cual soluciones de distinta concentración de ENP se utilizaron para su inmovilización sobre el electrodo modificado con el polisacárido. La corriente catalítica generada por la presencia del conjugado LPS-PEG-HRP en la superficie del electrodo, fue graficada en función de la concentración de ENP utilizada. Puede observarse que a bajas concentraciones de ENP la respuesta que se obtiene es baja y coincide con el valor de corriente que se obtiene para un electrodo Au/Cys/CMDex70 sin modificar con la proteína de reconocimiento ($300 \pm 30 \text{ nA cm}^{-2}$). La diferencia entre la respuesta específica y la inespecífica se hace pronunciada a medida que aumenta la concentración de ENP por encima de $0,1 \mu\text{M}$. Considerando que el ensayo requiere un número limitado de sitios de reconocimiento disponibles para la competencia, se escogió $1 \mu\text{M}$ como concentración de ENP para la modificación de los electrodos. La concentración de conjugado LPS-PEG-HRP seleccionada fue $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, dado que presenta una respuesta fácilmente medible y está por debajo de la concentración micelar crítica [31].

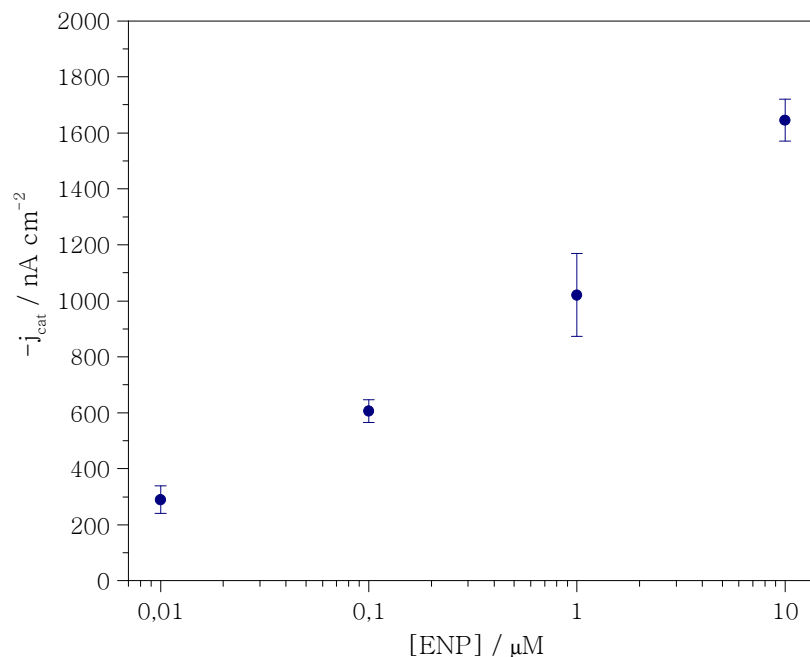


Figura 8.6: Adsorción de LPS-PEG-HRP $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ sobre electrodos Au/Cys/CMDex70/ENP.

8.3.3 – Ensayo competitivo

En las condiciones descritas en la sección 8.2.5 se prosiguió a la realización del ensayo competitivo. En este ensayo, la superficie con el agente de reconocimiento inmovilizado se pone en contacto con una mezcla de LPS-PEG-HRP y LPS, los cuales competirán por los sitios de unión a ENP (Figura 8.7). Para altas concentraciones de LPS, se espera que una cantidad nula de conjugado se una a los sitios de reconocimiento y la señal caiga a cero, mientras que para muy bajas concentraciones de LPS, una elevada concentración de LPS-PEG-HRP interaccionará con ENP y la señal será máxima. En consecuencia la señal será inversamente proporcional a la concentración de LPS en la solución.

La Figura 8.8 muestra la curva de calibración logarítmica, de corriente catalítica a potencial constante en función de la concentración de LPS, resultado del ensayo competitivo entre LPS y LPS-PEG-HRP, para una concentración fija de conjugado de 5000 ng mL^{-1} . La forma de la curva no se corresponde con la típica forma que se espera para un ensayo competitivo como ha sido descrito en la sección 2.4. Su forma es característica de la situación particular cuando existe un defecto de receptores en la superficie del electrodo (sección 2.4 Figura 2.12). Por otro lado, el cambio pronunciado de señal en un intervalo pequeño de concentraciones es consistente con la fuerte

interacción del receptor con el lípido A del LPS ($K_d \approx 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ [298]) [113]. Estudios previos de este sistema [122], indican que ENP forma un cubrimiento completo de la superficie en las condiciones utilizadas en este ensayo. Por lo tanto, la respuesta observada en la curva dosis-respuesta no sería consecuencia de una baja concentración de receptor en la superficie, sino de la capacidad de los mismos para interaccionar con el LPS. En este sentido, debe considerarse la orientación y exposición de ENP en la superficie del electrodo. Su inmovilización involucra la unión covalente a la matriz de carboximetildextrán a través de la reacción de los grupos aminos de las lisinas de la proteína y los grupos carboxílicos del polímero. En consecuencia, el proceso de inmovilización y la ubicación del receptor en la estructura del polisacárido pueden afectar su capacidad para reconocer al analito. Por lo tanto, el comportamiento observado podría ser consecuencia de una baja concentración de receptores capaces de interaccionar eficientemente con el analito. Estas observaciones ponen en evidencia la trascendencia de la etapa de inmovilización de ENP. Naturalmente, la calidad del ajuste de la curva utilizando la ecuación 2.18 (sección 2.4) se verá afectada. Sin embargo, pueden obtenerse parámetros relevantes respecto del comportamiento del sistema.

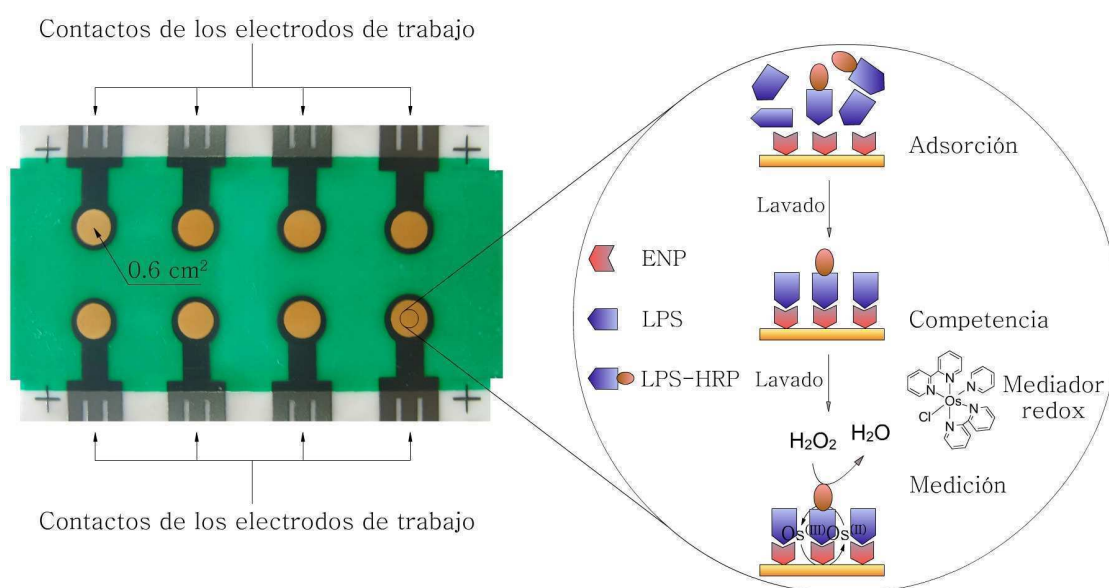


Figura 8.7: Placa de multielectrodos y esquema del ensayo competitivo entre LPS y LPS-HRP.

La ecuación 2.18, $Y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D$, como se introdujo en la sección 2.4, permite ajustar la respuesta experimental del ensayo competitivo. En esta ecuación, A es el valor máximo de corriente catalítica, B es la pendiente de la curva en el punto de inflexión, C es la concentración de analito de punto de inflexión y D es el valor mínimo

de corriente catalítica. El parámetro C , en la práctica corresponde a la concentración de LPS que disminuye la señal máxima al 50%, $IC_{50\%}$.

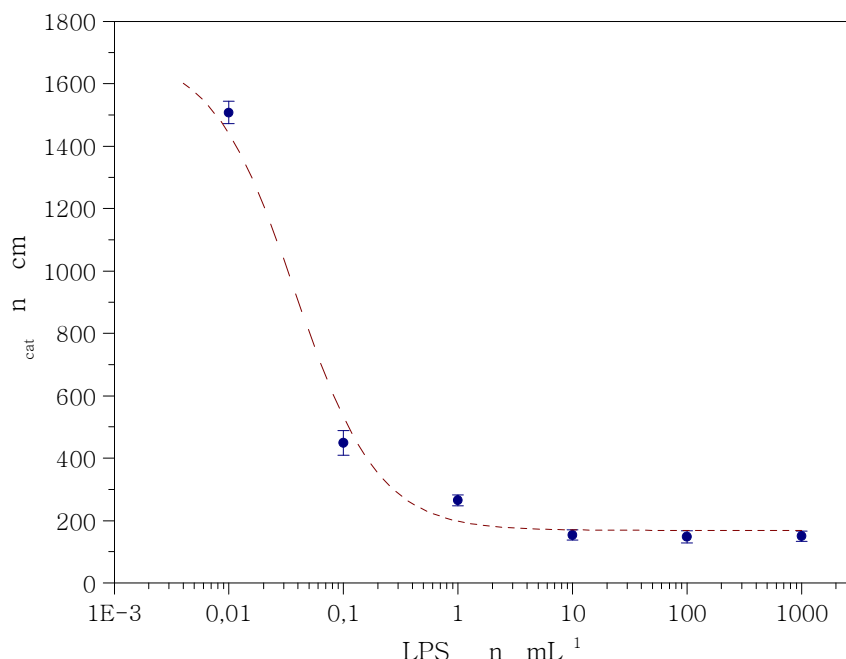


Figura 8.8 Curva de competencia. Ensayo competitivo llevado a cabo entre LPS PE y P 5 nM y concentración variable de LPS 1, nM . Ecuación de ajuste $D = 18 \pm 101$, $D = 1 \pm$, $1, \pm 0$, y $C = 0,05 \pm 0,0$. Las corrientes inyectadas son un promedio de al menos dos electrodos independientes.

Dada la competencia entre el LPS y el LPS con unido por los sitios de unión específicos sobre los electrodos, a mayor concentración de LPS, se observa menor señal de corriente y viceversa. A muy altas concentraciones de LPS, la señal observada es máxima debido a que el con unido se encuentra unido a todos los sitios disponibles sobre la superficie. En este caso, la concentración de LPS es lo suficientemente alta como para que no haya competencia. Para concentraciones de LPS superiores a $0,01 nM$ la señal disminuye producto de la competencia entre el LPS y el LPS con unido. A elevadas concentraciones de analito, el con unido se haya prácticamente desplazado de los sitios de unión. Sin embargo, la señal no cae a cero como predice el modelo sino que alcanza a un valor constante que se corresponde con la adsorción inespecífica. Para concentraciones de LPS mayores que $10 nM$, la señal se mantiene constante, tornándose insensible al cambio en la concentración, lo cual representa una limitación al ensayo. A altas concentraciones de analito, el ensayo se muestra muy sensible al

cambio de concentración, generando una importante disminución de la señal entre muestras que contienen 0,01 y 0,1 ng mL⁻¹ de LPS. Nótese que el ensayo presenta un aceptable comportamiento dentro del intervalo de concentraciones entre 0,01 y 10 ng mL⁻¹. La sensibilidad del ensayo, expresada como la concentración de LPS que reduce la señal máxima del ensayo al 50 % (IC_{50%}) es de (0,05 ± 0,02) ng mL⁻¹. Como se ha comentado en la sección 2.4, el criterio habitual utilizado para calcular el límite de detección corresponde a la concentración de analito que reduce la señal al 90 % del máximo (IC_{90%}). En este caso, dada la característica de la respuesta observada, un criterio más conservador es considerar como límite de detección el valor correspondiente a la IC_{50%}. Este valor, conociendo la actividad endotóxica del LPS empleado, corresponde a (0,06 ± 0,02) UE mL⁻¹, cifra significativamente inferior al valor límite establecido por las Farmacopeas Americana y Sueca, para drogas inyectables (0,25 EU mL⁻¹) [149].

Obsérvese la baja dispersión de los valores presentados en la curva de calibración. Estos resultados ponen de manifiesto el buen comportamiento de la plataforma multielectrodos respecto a la reproducibilidad del sistema. Un comportamiento similar ya se había evidenciado en el proceso de construcción del arreglo de electrodos (sección 3.6).

8.4 – Sumario

El estudio presentado en este capítulo explora exitosamente la posibilidad de determinar bajas concentraciones de endotoxinas empleando una estrategia de reconocimiento químico a través de un ensayo competitivo. En este sistema se modificaron superficies de oro con carboximetildextrán (70 kDa) obteniendo resultados satisfactorios respecto de la adsorción inespecífica de los analitos involucrados en el ensayo. Por otro lado, la matriz de polisacárido permite la generación de una superficie con reconocimiento específico de LPS, mediada por una versión recombinante de una proteína antimicrobiana presente en el sistema inmune del cangrejo herradura. El ensayo se llevó a cabo empleando una concentración constante del conjugado LPS-PEG-HRP y LPS presente en la muestra, permitiendo la detección de endotoxinas en bajas concentraciones en un ensayo alternativo al comúnmente empleado LAL test.

La combinación del sistema multielectrodos, el uso de carboximetildextrán y el conjugado sintetizado muestran una importante mejora respecto de los ensayos realizados previamente [148]. Entre los aspectos más destacados del ensayo podemos

citar: su alta reproducibilidad, su bajo límite de detección, su baja señal inespecífica y la marcada diferencia entre la corriente máxima y mínima.

En el próximo capítulo se presentará un análisis más minucioso del sistema descrito.

Capítulo **9**

Discusión y Conclusiones



9.1 – Conjugados de LPS

La síntesis de conjugados con un buen grado de funcionalización y que conserven su actividad endotóxica representa uno de los ejes centrales de este trabajo de tesis. El uso de derivados de LPS no se limita al desarrollo de sistemas para la detección de endotoxinas, sino que encuentra un amplio campo de aplicación en el estudio de rutas metabólicas [151–153], elucidación del mecanismo de la sepsis [299, 300], fisicoquímica de su agregación [33] y su interacción con moléculas de reconocimiento [61, 148] o superficies marcadas [154]. En todas estas áreas la calidad de los conjugados puede significar la diferencia entre el éxito y el fracaso de un estudio determinado. Es importante disponer de rutas sintéticas que permitan, no solo obtener derivados de LPS biológicamente activos y modificados con buen rendimiento, sino también que posibiliten su marcación con una amplia gama de sondas, no restrictiva a compuestos fluorescentes. Esto último hace posible, de acuerdo a los requisitos del estudio a realizar, seleccionar o sintetizar el derivado más conveniente.

Los grupos funcionales amino primario, hidracina e hidracida están presentes en una gran variedad de moléculas fluorescentes, enzimas, proteínas o péptidos, anticuerpos y moléculas espaciadoras. En consecuencia, desarrollar métodos de derivatización de LPS que involucren a moléculas con estos grupos funcionales proporciona un abanico de posibilidades respecto de la marcación de LPS con una gran variedad de sondas.

La literatura científica respecto a la conjugación de proteínas por modificación de grupos funcionales aldehídos, carboxilos, aminos o tioles es amplia; mientras que la información relativa a la modificación de polisacáridos es más limitada y se refiere principalmente a su oxidación con periodato. Como se ha introducido en el capítulo 1, son muy acotados los procedimientos sintéticos de modificación de LPS liso para la obtención de conjugados. El mayor número de métodos para su obtención está limitado a LPS detoxificado o proveniente de cepas mutantes. Estos hechos pueden entenderse considerando la complejidad que representa la molécula de lipopolisacárido, no solo respecto de su estructura química, sino también de su comportamiento micelar, sobretudo en solución acuosa. Adicionalmente, toda modificación química que se haga debe ser lo suficientemente moderada de forma tal de no afectar su actividad endotóxica.

Nuestro primer intento de conjugar al lipopolisacárido involucró su oxidación con periodato de sodio, seguida de una etapa de conjugación mediante una sonda con un

grupo hidracida o hidracina. Por esta vía se sintetizaron conjugados con biotina y dansilo. El uso de una sonda fluorescente como el dansilo permitió encontrar las condiciones de reacción más propicias para la síntesis del derivado con biotina. Esta estrategia posee la ventaja de utilizar una molécula pequeña como sonda, presentando a su vez el grupo funcional hidracina, el cual es más conveniente que el grupo amino ante la elección de las condiciones de trabajo. La adición del compuesto nitrogenado básico al carbono carbonílico implica un ataque nucleofílico. La protonación del oxígeno carbonílico hace al carbono correspondiente más susceptible al ataque por el nucleófilo. Por lo tanto, en lo que concierne al compuesto carbonílico, la adición se favorece con una acidez elevada. Sin embargo, el derivado amoniacal también puede protonarse para formar el ión $^+H_3N-R$, que carece de electrones no compartidos, de modo que deja de ser nucleófilo. Las hidracinas alifáticas son bases más débiles ($pK_a \approx 8$) que las aminas alifáticas ($pK_a \approx 10$). Esta propiedad permite trabajar a valores de pH donde se favorece la protonación del oxígeno carbonílico sin afectar significativamente la capacidad nucleofílica de la hidracina.

El conjugado LPS-biotina obtenido presentó un buen nivel de conjugación (50 nmoles biotina por mg de LPS) y una actividad endotóxica aceptable ($0,08 \text{ UE ng}^{-1}$), pero significativamente inferior a la del LPS utilizado para su síntesis ($0,4 \text{ UE ng}^{-1}$). Sin embargo, su potencia pirógena resultó ser superior a la del conjugado comercial LPS-HRP ($0,012 \text{ UE ng}^{-1}$) (AlerCHEK Inc.) utilizado previamente en un ensayo competitivo amperométrico [148]. La síntesis de LPS-biotina posibilitó el desarrollo de un procedimiento alternativo al ensayo competitivo precedente [164]. Los detalles de este método de cuantificación de endotoxinas se discutirán más adelante.

Otra de las alternativas empleadas consistió en la oxidación enzimática de los alcoholes primarios presentes en la galactosa del LPS mediante la enzima galactosa oxidasa. Como fue detallado en la sección 5.2.2.1, si bien la enzima funciona con muy buen rendimiento en monosacáridos de galactosa, el rendimiento de la reacción con LPS es prácticamente nulo.

Considerando la tendencia del LPS a formar agregados, otra de las estrategias evaluadas se centró en reacciones que se lleven a cabo sobre polisacáridos en fase heterogénea. Un método eficiente, utilizado habitualmente en la modificación de agarosa para la preparación de columnas de afinidad, es el uso de BrCN. El BrCN promueve la activación de los grupos hidroxilos del carbohidrato generando un éster cianato, que luego puede hacerse reaccionar con una molécula conteniendo un grupo hidracida, hidracina o amino primario. Este procedimiento dio lugar a la síntesis de un derivado de

LPS con dansilo con un excelente nivel de conjugación, correspondiente a la incorporación de 330 nmoles de fluoróforo por mg de LPS, conservando además un 90 % de su actividad endotóxica original ($1,7 \text{ UE ng}^{-1}$). Este resultado representa una notoria mejora respecto de los derivados de LPS que pueden hallarse comercialmente. Por ejemplo, Sigma ofrece un producto que presenta una conjugación máxima de 26 nmoles de FITC por mg de LPS de *E. Coli*. En forma similar, Tobias y colaboradores han informado la síntesis de conjugados de LPS Re595 (*S. Minnesota*) con FITC obteniendo una relación de conjugación de 130 nmoles por mg de LPS [152]; Troelstra y colaboradores han presentado también la síntesis de LPS Re595 con FITC obteniendo resultados comparables a los últimos [151]. Respecto de nuestros propios antecedentes, la relación de derivatización informada aquí es considerablemente superior a la que se obtuvo por el tratamiento oxidativo con periodato. El conjugado sintetizado de esa forma, utilizando LPS proveniente de la misma cepa bacteriana, presentaba una relación de conjugación de 50 nmoles de biotina por mg de LPS, y una actividad biológica significativamente inferior [164].

Por otro lado, con un procedimiento similar se sintetizó un conjugado de LPS con HRP, en primera instancia en forma directa, y en otro procedimiento, introduciendo previamente a la enzima una molécula espaciadora bifuncional. En este último caso, el rendimiento de conjugación del LPS fue muy satisfactorio, rindiendo 28 nmoles de HRP por mg de LPS, y conservando un 65 % de la actividad endotóxica original. De los resultados expuestos en la sección 6.3.2 se puso en evidencia que a lo largo de la síntesis de LPS-PEG-HRP se produce una pérdida significativa de la actividad catalítica de la enzima; la cual representa una limitación en la aplicación de este conjugado en ensayos competitivos amperométricos como los descritos en el capítulo 1. Aunque es claro que la utilización de una molécula espaciadora bifuncional presenta ventajas respecto a la conjugación de LPS con HRP, la numerosa cantidad de pasos sintéticos y, en particular los solventes empleados en la modificación de la enzima, genera una elevada reducción de la actividad enzimática. A pesar de esto, puede aplicarse sobre el conjugado, un procedimiento convencional de revelado por actividad de peroxidasa (Figura 6.11 B).

Uno de los puntos clave de esta síntesis converge en el solvente o mezcla de solventes que se utiliza. La elección de una mezcla de acetona-agua como solvente funciona correctamente. Esta elección constituye un compromiso entre dos posibles escenarios, uno es el uso de acetona pura, donde la peroxidasa presenta baja solubilidad; el otro corresponde a la utilización de un solvente acuoso, en donde el LPS

no solo posee una mayor tendencia a formar agregados, sino que además, una vez activado rápidamente se desactiva dando lugar a carbamatos inertes [253]. Otro aspecto a tener en cuenta es que en acetona acuosa la temperatura de la etapa de activación de los grupos hidroxilos con el complejo bromuro de N-ciano-trietilamonio puede mantenerse baja, evitando la rápida descomposición del complejo por encima de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ [301]. Se ha empleado el mismo protocolo descrito en la sección experimental, pero usando agua MilliQ como solvente. En estas condiciones, la conjugación de LPS con dansilo da lugar a un conjugado con apenas 5 nmoles del fluoróforo por mg de LPS; en el caso de la modificación con HRP el rendimiento fue nulo. Además, la mezcla acetona-agua permite trabajar más convenientemente con la mayoría de las moléculas fluorescentes sin pérdida de la actividad biológica del LPS.

Finalmente, esta efectiva modificación con moléculas conteniendo grupos hidracina o amino primario no solo permite seleccionar la molécula fluorescente de acuerdo a la longitud de onda de excitación y/o emisión requerida para un estudio particular, sino que también permite el uso de otras técnicas como el revelado por actividad [302], luminiscencia [303] o amperometría [304], que en conjunto constituyen herramientas muy importantes para el estudio de las propiedades químicas y biológicas del LPS.

A pesar de todas las ventajas que proporcionó el uso de BrCN en la obtención de derivados de LPS con distintas sondas, existen algunos inconvenientes. El BrCN es uno de los reactivos más peligrosos de manipular en el laboratorio, la reacción de activación debe realizarse a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que limita el uso de ciertos reactivos, acotando la elección de un solvente o mezcla de solventes adecuados. De los resultados obtenidos en la sección 6.3.2 quedó demostrado que las condiciones de reacción no son las más adecuadas si se intenta modificar LPS con HRP.

La activación de los grupos hidroxilos de un carbohidrato también puede lograrse empleando CDAP. El uso de CDAP proporciona la posibilidad de llevar a cabo la activación y modificación de un polisacárido en solvente acuoso, siendo más adecuado para la conjugación de enzimas. Sin embargo, cuando se extiende este procedimiento al LPS, su agregación se convierte en un factor determinante en el rendimiento de reacción. El uso de compuestos anfifílicos, particularmente NaDC, permitió sortear este impedimento posibilitando la síntesis de conjugados de LPS con dansilo y con HRP, previa modificación con una molécula PEG espaciadora. Con esta alternativa sintética, se obtuvo un derivado de LPS con HRP con excelente relación de conjugación, una satisfactoria actividad enzimática, y muy buena actividad pirógena, $0,3\text{ UE ng}^{-1}$, que

representa la conservación del 60 % de la actividad original de la fracción de LPS. Obsérvense las excelentes características del conjugado sintetizado en relación a diversos conjugados comercialmente disponibles (Tabla 9.1). Es notable la diferencia en actividad endotóxica que existe entre nuestro conjugado LPS-PEG-HRP y un análogo comercializado por AlerCHEK Inc. En lo que respecta a la actividad biológica de la peroxidasa, es este último conjugado el que presenta una ventaja significativa. Pierce comercializa un derivado de neutravidina con HRP con una actividad enzimática de 120 U mg^{-1} , muy similar a la informada para nuestro conjugado, siendo en su caso un derivado netamente proteico, sin las complicaciones que introduce la química del LPS. Sigma, por otro lado, comercializa una serie de conjugados de LPS de *E. Coli* O26-B6 con FITC, una molécula significativamente más pequeña que la peroxidasa, con relaciones de conjugación similares a las correspondientes a nuestro derivado.

Muestra	[Proteínas] (Bradford) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	[Proteínas] (Abs. 403 nm) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Conjugación (nmoles sonda por mg de polímero)	Act. Enzimática (U mg^{-1})	Act. Endotóxica (UE ng^{-1})
LPS-PEG-dHRP ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$)	225 ± 15		29 ± 4	98 ± 8	$0,30 \pm 0,05$
		178 ± 4	21 ± 3	120 ± 10	$0,30 \pm 0,05$
LPS-HRP (AlerCHEK)	nd	nd	nd	$250 \pm 15^*$	$0,012 \pm 0,006$
LPS-FITC (Sigma)	–	–	$5,2 - 25,7^*$	–	sd *

* Datos del proveedor. nd: no determinado. sd: sin datos.

Tabla 9.1: Comparación entre el conjugado LPS-PEG-HRP y conjugados comerciales.

Optimizando las condiciones de oxidación de la enzima pudo obtenerse un derivado LPS-PEG-HRP con una actividad enzimática correspondiente a un tercio de la actividad original, lo que constituye una notable mejora respecto a su análogo sintetizado vía BrCN. El uso de un agente capaz de activar los grupos hidroxilos del LPS en medio acuoso permitió realizar la conjugación con peroxidasa en un ambiente más conveniente para la enzima. Nótese que el cambio de solvente tiene además un efecto significativo sobre el rendimiento de conjugación. En el caso del BrCN, el uso de una mezcla acuosa de acetona favorece la incorporación del dansilo rindiendo 330 nmoles de fluoróforo por mg de LPS. Sin embargo, empleando un medio netamente

acuoso, la incorporación de dansilo se reduce a un tercio en el mejor de los casos, 110 nmoles de fluoróforo por mg de LPS. Si bien la comparación de los agentes activantes no es tan trivial, el uso de acetona como medio de reacción beneficia la disolución del dansilo favoreciendo su conjugación con el LPS activado mientras que el uso de un medio acuoso promueve la agregación del LPS dificultando su modificación. Estas dos condiciones facilitan la incorporación del dansilo al LPS en un ambiente orgánico. En el caso de la modificación de LPS con HRP, ambas estrategias proveen resultados similares, pero con una clara diferencia a favor del derivado obtenido con CDAP respecto a la conservación de la actividad enzimática. En este último caso, si bien el uso de un medio de reacción acuoso beneficia la disolución de la enzima, también dificulta la incorporación de HRP al LPS, dado que se favorece la agregación del mismo.

El uso de CDAP, como se ha introducido en el capítulo 7, es una excelente alternativa al BrCN en la síntesis de derivados de LPS con glicoproteínas en general. No solo provee una alternativa menos peligrosa sino que además permite emplear medios de reacción acuosos, siendo éstos, ambientes más adecuados para trabajar con enzimas. La principal objeción que tiene este medio es que favorece la agregación del LPS dificultándose su modificación. Sin embargo, hemos demostrado que usando agentes anfífilos en las condiciones adecuadas puede superarse este inconveniente permitiendo la obtención de conjugados con propiedades catalíticas y endotóxicas satisfactorias.

9.2 – Ensayos para la detección de endotoxinas

Como se ha introducido en el capítulo 1, existe un gran interés en el desarrollo de sistemas específicos de detección de endotoxinas como alternativa a las distintas variantes del ensayo LAL. Este hecho es motivado por la elevada toxicidad del LPS y por las desventajas de los sistemas de detección basados en el lisado de amebocitos del *Limulus Polyphemus*. En los últimos años se han propuesto algunas opciones para la detección de endotoxinas en bajas concentraciones, sin embargo, aún ninguna de ellas se ha introducido en la práctica.

En esta área de investigación, nuestro grupo ha presentado previamente dos métodos para la detección de endotoxinas basados en ensayos competitivos con detección electroquímica. En el año 2005 se publicó un trabajo el cual describía el uso de electrodos de oro funcionalizados con una proteína de reconocimiento: ENP [148]. Esta superficie permitió desarrollar un ensayo competitivo entre un conjugado

comercial, LPS-HRP, y LPS proveniente de la muestra a analizar. La competencia entre el conjugado y el LPS por los sitios de reconocimiento en la superficie del electrodo, generaba una disminución en la corriente amperométrica a medida que la concentración de LPS de la muestra aumentaba. Con la configuración covalente (Figura 9.1), similar a la desarrollada en este trabajo de tesis (capítulo 8), se alcanzó una corriente máxima de $1,4 \mu\text{A cm}^{-2}$, correspondiente a un cubrimiento de conjugado de $0,08 \text{ pmoles cm}^{-2}$, y una corriente debida a adsorción inespecífica de $0,9 \mu\text{A cm}^{-2}$. En estas condiciones, el ensayo proveía un límite de detección de $1,5 \text{ UE mL}^{-1}$. Como se comentó en la sección 1.5.1, las principales limitaciones del ensayo se deben a la baja actividad endotóxica del conjugado utilizado y la elevada señal correspondiente a la adsorción inespecífica. Esto es consecuencia de la necesidad de utilizar altas concentraciones de conjugado y del propio comportamiento del carboximetildextrán (CMDex24) utilizado en la modificación de la superficie del electrodo.

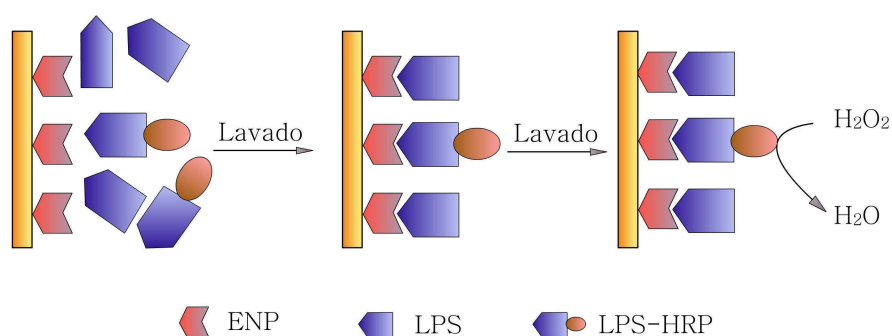


Figura 9.1: Esquema del ensayo competitivo entre LPS y LPS-HRP (AlerCHEK Inc.).

Con el desarrollo de conjugados de LPS, se introdujo la posibilidad de nuevas alternativas al ensayo precedente. La síntesis de un conjugado de LPS con biotina (sección 5.3.2), con una actividad endotóxica mejorada respecto del conjugado de LPS-HRP comercial, permitió el desarrollo de otra configuración de ensayo competitivo amperométrico, cuyos resultados fueron publicados en el año 2007 [164]. Los componentes clave de este ensayo fueron, el elemento de reconocimiento ENP, el conjugado LPS-biotina y el elemento responsable de generar la señal, el conjugado N-HRP (Figura 9.2). A diferencia de la configuración anterior, la concentración de LPS en la superficie del electrodo no se determinaba en forma directa, sino que involucraba otro paso correspondiente a la interacción de la biotina unida al LPS con el derivado N-HRP.

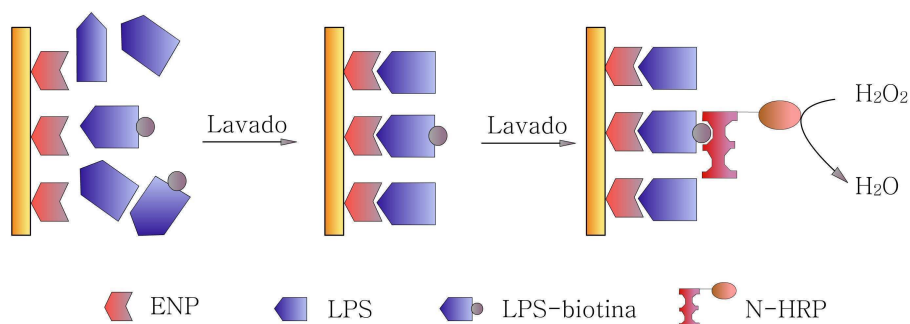


Figura 9.2: Ensayo competitivo entre LPS y LPS-biotina. Se emplea N-HRP como el elemento generador de la señal.

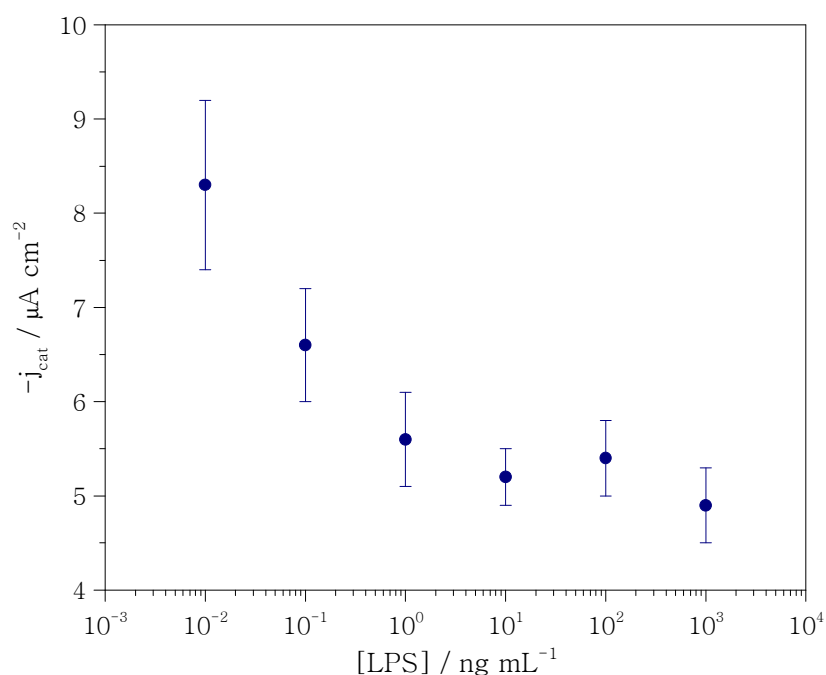


Figura 9.3: Curva de calibración logarítmica para el ensayo competitivo con una concentración fija de LPS-biotina ($10 \mu g mL^{-1}$) y concentraciones variables de LPS. La presencia de LPS-biotina se revela por la unión de N-HRP. Los electrodos se modificaron en un procedimiento similar al descrito en la sección 8.2.2 con $[ENP] = 0,8 \mu M$. $[N-HRP] = 25 \mu g mL^{-1}$, $[Os(II)] = 40 \mu M$, $[H_2O_2] = 1 mM$.

La señal máxima obtenida fue de $7,8 \mu A cm^{-2}$, mientras que la señal correspondiente a la adsorción inespecífica fue de $5 \mu A cm^{-2}$. Un cambio importante en la señal pudo observarse entre muestras que contenían $0,01$ y $0,1 ng mL^{-1}$ de LPS, mientras que el ámbito dinámico se extendía hasta $1 ng mL^{-1}$ (Figura 9.3). En este ensayo, se obtuvo una diferencia de $2,8 \mu A cm^{-2}$ entre concentraciones extremas, lo

que representaba una importante mejora respecto del ensayo competitivo precedente, donde esa diferencia de corriente correspondía a $0,5 \mu\text{A cm}^{-2}$. Entre otras cosas, se obtuvo un valor mayor de corriente de saturación, $7,8 \mu\text{A cm}^{-2}$ versus $1,4 \mu\text{A cm}^{-2}$, así como una mayor corriente debida a la unión inespecífica de N-HRP. Si bien este ensayo presentaba intensidades de corriente superiores al ensayo anterior, lo cual permitiría su miniaturización, agregaba una nueva etapa al procedimiento sumando tiempo de ensayo y complejidad, y afectando notablemente la adsorción inespecífica.

Uno de los objetivos de este trabajo de tesis fue mejorar los ensayos para la detección de endotoxinas teniendo en cuenta principalmente dos puntos; la síntesis de conjugados de LPS de mejor calidad, y la mejora de la superficie de ensayo respecto a la adsorción inespecífica.

En el capítulo 4 se describió el desarrollo de distintas variantes de cubrimiento de un electrodo de oro utilizando derivados del dextrano y polietilenglicoles de modo de minimizar la adsorción inespecífica de una proteína hidrofóbica como la neutravidina. En particular, el carboximetildextrán70 o una combinación de CMDex con PEG5000 produjeron los mejores resultados disminuyendo la adsorción inespecífica en un orden de magnitud respecto de la superficie de oro sin modificar u oro modificado con cistamina. La elección del CMDex70 como matriz para el ensayo competitivo desarrollado en el capítulo 8, se justifica por su buen comportamiento como superficie que rechaza la adsorción del LPS y además porque posibilita la inmovilización covalente de la proteína de reconocimiento. Por su parte, la incorporación de cada uno de los elementos a la superficie de oro pudo evaluarse por diversas técnicas incluyendo: voltametría de desorción reductiva, elipsometría y espectroscopía fotoelectrónica de rayos X.

El otro punto crítico del ensayo correspondía a la calidad del conjugado LPS-HRP. Distintas estrategias sintéticas se implementaron para su desarrollo, accediendo a las condiciones más adecuadas con la utilización de CDAP como agente activante del LPS y posterior conjugación, en presencia de compuestos anfifílicos, con un derivado de la enzima, HRP-PEG-NH₂.

Con estos nuevos elementos se procedió a la realización de un ensayo competitivo amperométrico. Entre los aspectos más relevantes del ensayo puede citarse el importante cambio de señal que se observa entre muestras que contienen $0,01 \text{ ng mL}^{-1}$ y $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ de LPS, extendiéndose el ámbito dinámico hasta 10 ng mL^{-1} . La corriente debida a la adsorción inespecífica es pequeña en comparación con la máxima señal obtenida, lo que introduce un claro progreso respecto del ensayo análogo con

LPS-biotina [164] y el correspondiente utilizando un conjugado de LPS-HRP comercial [148]. En este último, empleando una concentración de mediador de 45 μM (más del doble de la empleada en el ensayo descrito en el capítulo 8) se obtuvo una corriente máxima similar ($1,4 \mu\text{A cm}^{-2}$) pero con una corriente debida a procesos de adsorción inespecífica de $0,9 \mu\text{A cm}^{-2}$, cuatro veces mayor que la que presenta esta nueva versión del ensayo competitivo. Estos resultados están relacionados con dos aspectos fundamentales: el uso de una menor concentración de conjugado LPS-PEG-HRP y el uso de CMDex70 como matriz. Su combinación provee una significativa disminución de la adsorción inespecífica dando lugar a una mayor diferencia entre valores extremos de corriente, $1,3 \mu\text{A cm}^{-2}$ frente al $0,5 \mu\text{A cm}^{-2}$ previamente reportado [148]. Todos estos resultados sugieren un mejor comportamiento del conjugado de LPS-PEG-HRP sintetizado según lo descrito en el capítulo 7 respecto del adquirido comercialmente y una respuesta satisfactoria del polisacárido empleado para modificar los electrodos.

Otro de los puntos sobresalientes del ensayo desarrollado en el capítulo 8 corresponde al uso de la plataforma multielectrodos. Este sistema no solo permite analizar 8 electrodos simultáneamente, lo que significa un ahorro sustancial de tiempo en el procedimiento del ensayo, sino que además posee un impacto muy satisfactorio en la reproducibilidad de las mediciones. Esto último se verifica en la baja dispersión que existe entre duplicados y triplicados de un mismo punto de la curva logarítmica de calibración.

En la sección 2.2.5 se presentó un modelo para la catálisis de HRP y su conexión con un mediador redox cuando la enzima se encuentra inmovilizada en una película y el mediador se encuentra en solución. El tratamiento realizado considera que la concentración de sustrato (H_2O_2) es mucho mayor que la concentración de mediador (Os(II)), por lo que la reacción enzima-sustrato es la que controla la velocidad del proceso global. Además, la concentración de sustrato es tal que no inhibe la actividad de la enzima. Por otro lado, en este modelo de película delgada se considera que no hay gradiente de concentración, ni de mediador, ni de sustrato, con lo cual la concentración de Os(II) en la cercanía del electrodo es igual a la del seno de la solución. Bajo estas condiciones, a partir de las corrientes obtenidas, la concentración de mediador y la constante de velocidad del paso limitante (k_3), puede determinarse la concentración superficial del conjugado LPS-PEG-HRP.

La corriente máxima que se obtiene en el ensayo competitivo corresponde a $1,5 \mu\text{A cm}^{-2}$. Teniendo en cuenta la concentración de mediador y la constante de velocidad del paso limitante, utilizando la ecuación 2.16, se predice un cubrimiento de

$(0,26 \pm 0,01)$ pmoles cm^{-2} de enzima. En función de la estequiometría del conjugado, considerando una masa molecular de LPS de 20 kDa, se obtiene una concentración superficial de LPS de $(0,45 \pm 0,02)$ pmoles cm^{-2} . Este resultado corresponde a una concentración 3 veces mayor que la obtenida para el ensayo competitivo precedente, donde incluso, se utiliza una concentración de conjugado del doble en la etapa de adsorción. Esto pone en evidencia la mayor interacción de nuestro conjugado con el elemento de reconocimiento respecto del análogo comercial.

La concentración de conjugado calculada a partir de la corriente máxima obtenida en el ensayo dista aproximadamente en un orden de magnitud respecto al valor para una monocapa de un conjugado voluminoso como la N-HRP ($3,7$ pmoles cm^{-2}) [175]. De estudios previos [122], en las condiciones de la inmovilización de ENP (sección 8.2.2) se obtiene un cubrimiento total de la superficie. Se esperaría entonces una mayor adsorción de conjugado y consecuentemente un valor mayor de corriente máxima. Si bien, la mejora de la actividad endotóxica del conjugado de LPS con HRP mejoró sustancialmente su interacción con la molécula de reconocimiento, en comparación con lo que se había obtenido previamente, los valores de corriente máxima obtenidos son significativamente inferiores de lo que se esperaría para la concentración superficial de ENP. Aquí deben tenerse en cuenta varios aspectos:

- Se considera que la inmovilización del conjugado no afecta la actividad de la HRP, con lo que se podría estar subestimando la concentración superficial de LPS-PEG-HRP.
- El proceso de inmovilización de ENP podría disminuir su capacidad para interaccionar con el lípido A del LPS. Este efecto puede producirse al afectar su orientación así como por modificación estructural o química de la región involucrada en el reconocimiento. De hecho, la proteína se inmoviliza por reacción de sus residuos de lisina con los grupos carboxílicos del carboximetildextrán, estando algunos de esos residuos en la región responsable de la interacción específica con el lípido A.
- El CMDex70 podría ocultar la molécula de reconocimiento en su matriz, dificultando el acceso del LPS al ENP. Un efecto análogo al que se comentó en el capítulo 4 para CMDex modificado con biotina.

9.3 – Conclusiones

La experiencia del grupo de trabajo en esta área comenzó con el inicio de la tesis doctoral de la Dra. Priano. En su trabajo de tesis se comenzó a explorar la posibilidad de desarrollar un método alternativo al actualmente utilizado ensayo LAL para la detección de endotoxinas. Un método más automatizado, que dependa menos de la calificación del operador, utilizando reactivos que no involucren la captura de un animal que no se puede criar en cautiverio, como es el caso del cangrejo herradura.

Este trabajo de tesis surge como una continuación enfocándose en algunos aspectos puntuales de los ensayos competitivos previamente desarrollados. Uno de los puntos centrales consistió en mejorar la calidad de los conjugados de LPS, no solo pensando en el desarrollo de nuevos ensayos competitivos para la detección de endotoxinas, sino considerando la necesidad de disponer de procedimientos sintéticos que puedan aplicarse en forma global a las necesidades de distintas áreas de investigación. El otro aspecto relevante que se trató en el desarrollo de esta tesis, fue evaluar distintas alternativas para modificar una superficie de oro con polímeros hidrofílicos de modo de minimizar la adsorción inespecífica tanto de proteínas como de LPS. La relevancia de este aspecto involucra el hecho de que en su ambiente natural, la mayoría de las biomoléculas presentan una elevada tendencia a adsorberse físicamente sobre sustratos sólidos desprovistos de receptores específicos. Este comportamiento reduce la eficiencia de muchos ensayos de afinidad. El desarrollo de una superficie donde se pueda inmovilizar el receptor específico y que a su vez minimice la interacción no específica permitiría obtener una relación óptima entre la señal específica y la señal no específica aumentando la sensibilidad del dispositivo.

En este trabajo de tesis se exploró exitosamente la síntesis de diversos conjugados de LPS. A lo largo de los capítulos 5, 6 y 7 se describieron distintas estrategias sintéticas que permitieron obtener derivados con buenas características tanto de conjugación como de actividad endotóxica. Particularmente, lo que se desprende de la información presentada en esos capítulos es la eficiencia del procedimiento utilizando BrCN para la obtención de LPS marcado con fluoróforos. Este método, si bien presenta algunas desventajas respecto a la peligrosidad del reactivo empleado, provee conjugados de LPS con un excelente rendimiento de conjugación conservando prácticamente intacta la actividad biológica del LPS. Su extensión a un derivado con HRP produjo valores satisfactorios de conjugación y actividad pirógena, sin embargo, afectaba notablemente la actividad de la enzima. Una estrategia en medio

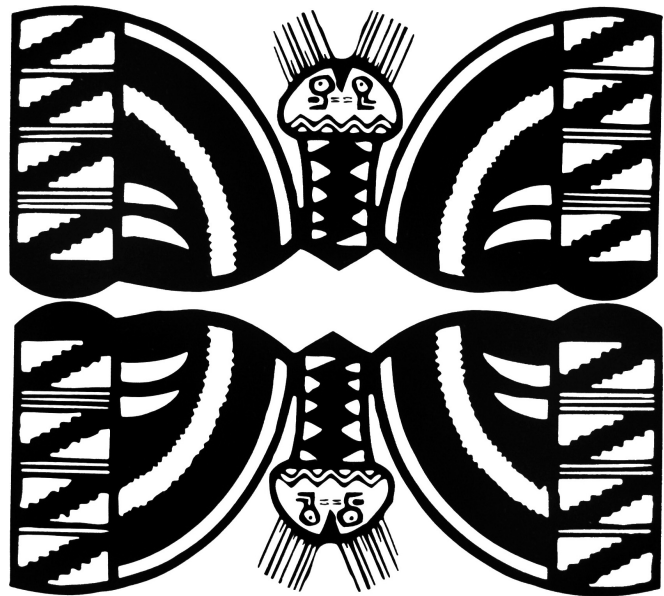
acuoso utilizando CDAP como agente activante del LPS permitió sortear ese inconveniente posibilitando la síntesis de un derivado de LPS con HRP con buenas características de conjugación, actividad pirógena y actividad enzimática. El uso de periodato posee como principal ventaja la sencillez de su procedimiento. Si bien se obtienen los derivados con la menor actividad pirogénica de todos los conjugados presentados, el método provee una vía rápida y sencilla de obtener LPS marcado con sondas de tamaño pequeño.

Los conjugados sintetizados presentan excelentes características en comparación con los conjugados disponibles comercialmente y con los reportados en bibliografía. Esto pone en evidencia la contribución de este trabajo de tesis en esta área.

Combinando la plataforma de 8 electrodos de oro modificados con CMDex70 y la proteína de reconocimiento ENP, y el conjugado LPS-PEG-HRP sintetizado con el procedimiento utilizando CDAP, se desarrolló un ensayo competitivo amperométrico para la detección de endotoxinas. Los resultados muestran que puede detectarse la presencia de endotoxinas en concentraciones de $0,06 \text{ UE mL}^{-1}$, una concentración significativamente inferior al límite de detección del ensayo precedente utilizando una configuración similar ($1,5 \text{ UE mL}^{-1}$) [148], y por debajo del límite establecido por la Farmacopea Americana para inyectables ($0,25 \text{ UE mL}^{-1}$). El ensayo además mostró una baja dispersión de las mediciones y una mayor diferencia entre valores extremos de corriente en comparación con ese mismo ensayo. Estas características son consecuencia de la calidad del conjugado utilizado, el comportamiento satisfactorio del CMDex70 como matriz y el uso de la placa multielectrodos.

Como se ha comentado en la discusión, se han logrado mejoras importantes al ensayo aumentando la calidad del conjugado de LPS y disminuyendo la adsorción inespecífica. Como trabajo a futuro podría intentarse mejorar la etapa de inmovilización del agente de reconocimiento ya que constituye una etapa crítica del ensayo. Una mejora en la especificidad podría alcanzarse por un cambio en la orientación y la ubicación de la proteína. La utilización de una molécula espaciadora podría facilitar la exposición del receptor a la solución, evitando los problemas asociados con su oclusión dentro de la matriz de CMDex. Por otro lado, podría evaluarse su unión a la matriz de CMDex mediante una reacción que no involucre a los grupos aminos de los residuos de lisina. Una alternativa posible sería hacerlo a través de los grupos carboxílicos de los residuos de aspártico y glutámico.

Referencias



1. Kamio, Y., and Nikaido, H. Outer Membrane of Salmonella Typhimurium Accessibility of Phospholipid Head Groups to Phospholipase C and Cyanogen Bromide Activated Dextran in External Medium *Biochemistry* **15**,(1976) 2561–2570.
2. Raetz, C. R. H., and Whitfield, C. Lipopolysaccharide Endotoxins *Annual Review of Biochemistry* **71**,(2002) 635–700.
3. Amersfoort, E. S. v., Berkel, T. J. C. v., and Kuiper, J. Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock *Clinical Microbiology Reviews* **16**,(2003) 379–414.
4. Raetz, C. R., Reynolds, C. M., Trent, M. S., and Bishop, R. E. Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria *Annual review of biochemistry* **76**,(2007) 295–329.
5. Brandenburg, K., Andra, J., Müller, M., Koch, M. H. J., and Garidel, P. Physicochemical Properties of Bacterial Glycopolymers in Relation to Bioactivity *Carbohydrate Research* **338**,(2003) 2477–2489.
6. Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Ulmer, A. J., Holst, O., Brade, H., Schmidt, G., Mamat, U., Grimmecke, H. D., Kusumoto, S., and Zahringer, U. The Chemical-Structure of Bacterial-Endotoxin in Relation to Bioactivity *Immunobiology* **187**,(1993) 169–190.
7. Zahringer, U., Lindner, B., and Rietschel, E. T. Molecular Structure of Lipid A, the Endotoxic Center of Bacterial Lipopolysaccharides *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* **50**,(1994) 211–276.
8. Taylor, A. H., Heavner, G., Nedelman, M., Sherris, D., Brunt, E., Knight, D., and Ghrayeb, J. Lipopolysaccharide (Lps) Neutralizing Peptides Reveal a Lipid A Binding-Site of Lps Binding-Protein *Journal of Biological Chemistry* **270**,(1995) 17934–17938.
9. Kotani, S., Takada, H., Tsujimoto, M., Ogawa, T., Takahashi, I., Ikeda, T., Otsuka, K., Shimauchi, H., Kasai, N., Mashimo, J., Nagao, S., Tanaka, A., Tanaka, S., Harada, K., Nagaki, K., Kitamura, H., Shiba, T., Kusumoto, S., Imoto, M., and Yoshimura, H. Synthetic Lipid A with Endotoxic and Related Biological Activities Comparable to Those of a Natural Lipid A from an Escherichia Coli Re Mutant *Infection and Immunity* **49**,(1985) 225–237.
10. Galanos, C., Luderitz, O., Rietschel, E. T., Westphal, O., Brade, H., Brade, L., Freudenberg, M., Schade, U., Imoto, M., Yoshimura, H., Kusumoto, S., and Shiba, T. Synthetic and Natural Escherichia Coli Free Lipid A Express Identical Endotoxic Activities *European Journal of Biochemistry* **148**,(1985) 1–5.
11. Takahashi, I., Kotani, S., and Takada, H. Requirement of a Properly Acylated a(1-6)-D-Glucosamine Disaccharide Bisphosphate Structure for Efficient Manifestation of Full Endotoxic and Associated Bioactivities of Lipid A *Infection and Immunity* **55**,(1987) 57–68.
12. Petsch, D., and Anspach, F. B. Endotoxin Removal from Protein Solutions *Journal of Biotechnology* **76**,(2000) 97–119.

13. Brade, H., Opal, S. M., N., V. S., and C., M. D. Endotoxin in Health and Disease *New York: Marcel Dekker*,(1999).
14. Hirayama, C., and Sakata, M. Chromatographic Removal of Endotoxin from Protein Solutions by Polymer Particles *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **781**,(2002) 419-432.
15. Schromm, A. B., Brandenburg, K., Loppnow, H., Zahringer, U., Rietschel, E. T., Carroll, S. F., Koch, M. H. J., Kusumoto, S., and Seydel, U. The Charge of Endotoxin Molecules Influences their Conformation and IL-6-Inducing Capacity *Journal of Immunology* **161**,(1998) 5464-5471.
16. Brandenburg, K., Mayer, H., Koch, M. H. J., Weckesser, J., Rietschel, E. T., and Seydel, U. Influence of the Supramolecular Structure of Free Lipid A on Its Biological Activity *European Journal of Biochemistry* **218**,(1993) 555-563.
17. Snyder, S., Kim, D., and McIntosh, T. J. Lipopolysaccharide Bilayer Structure: Effect of Chemotype, Core Mutations, Divalent Cations, and Temperature *Biochemistry* **38**,(1999) 10758-10767.
18. Coughlin, R. T., Haug, A., and McGroarty, E. J. Physical Properties of Defined Lipopolysaccharide Salts *Biochemistry* **22**,(1983) 2007-2013.
19. Brandenburg, K., and Seydel, U. Investigation into the Fluidity of Lipopolysaccharide and Free Lipid A Membrane Systems by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Differential Scanning Calorimetry *European Journal of Biochemistry* **191**,(1990) 229-236.
20. Garidel, P., Rappolt, M., Schromm, A. B., Howe, J., Lohner, K., Andra, J., Koch, M. H. J., and Brandenburg, K. Divalent Cations Affect Chain Mobility and Aggregate Structure of Lipopolysaccharide from Salmonella Minnesota Reflected in a Decrease of its Biological Activity *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1715**,(2005) 122-131.
21. Panda, A. K., and Chakraborty, A. K. Interaction of Mixed Surfactants with Bacterial Lipopolysaccharide *Journal of Colloid and Interface Science* **203**,(1998) 260-264.
22. Shands Jr, J. W., and Chun, P. W. The Dispersion of Gram-Negative Lipopolysaccharide by Deoxycholate. Subunit Molecular Weight *Journal of Biological Chemistry* **255**,(1980) 1221-1226.
23. Shnyra, A., Hultenby, K., and Lindberg, A. A. Role of the Physical State of Salmonella Lipopolysaccharide in Expression of Biological and Endotoxic Properties *Infection and Immunity* **61**,(1993) 5351-5360.
24. Morrison, D., and Ryan, J. Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides *CRC Press, USA* **I**,(1992).
25. Labischinski, H., Barnickel, G., Bradaczek, H., Naumann, D., Rietschel, E. T., and Giesbrecht, P. High State of Order of Isolated Bacterial Lipopolysaccharide and Its Possible Contribution to the Permeation Barrier Property of the Outer-Membrane *Journal of Bacteriology* **162**,(1985) 9-20.

-
26. Seydel, U., Brandenburg, K., Koch, M. H. J., and Rietschel, E. T. Supramolecular Structure of Lipopolysaccharide and Free Lipid A under Physiological Conditions as Determined by Synchrotron Small-Angle X-Ray-Diffraction *European Journal of Biochemistry* **186**,(1989) 325–332.
 27. Brandenburg, K., Koch, M. H. J., and Seydel, U. Phase Diagram of Lipid A from Salmonella Minnesota and Escherichia Coli Rough Mutant Lipopolysaccharide *Journal of Structural Biology* **105**,(1990) 11–21.
 28. Kastowsky, M., Gutberlet, T., and Bradaczek, H. Comparison of X-Ray Powder-Diffraction Data of Various Bacterial Lipopolysaccharide Structures with Theoretical-Model Conformations *European Journal of Biochemistry* **217**,(1993) 771–779.
 29. Brandenburg, K., and Wiese, A. Endotoxins: Relationships between Structure, Function, and Activity *Current Topics in Medicinal Chemistry* **4**,(2004) 1127–1146.
 30. Wiström, C. A., Jones, G. M., Tobias, P. S., and Sklar, L. A. Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis of Lipopolysaccharide in Detergent Micelles *Biophysical Journal* **70**,(1996) 988–997.
 31. Aurell, C. A., and Wistrom, A. O. Critical Aggregation Concentrations of Gram-Negative Bacterial Lipopolysaccharides (LPS) *Biochemical and Biophysical Research Communications* **253**,(1998) 119–123.
 32. Santos, N. C., Silva, A. C., Castanho, M., Martins-Silva, J., and Saldanha, C. Evaluation of Lipopolysaccharide Aggregation by Light Scattering Spectroscopy *Chembiochem* **4**,(2003) 96–100.
 33. Yu, L. L., Tan, M. Y., Ho, B., Ding, J. L., and Wohland, T. Determination of Critical Micelle Concentrations and Aggregation Numbers by Fluorescence Correlation Spectroscopy: Aggregation of a Lipopolysaccharide *Analytica Chimica Acta* **556**,(2006) 216–225.
 34. Bone, R. C. A Critical-Evaluation of New Agents for the Treatment of Sepsis *Jama—Journal of the American Medical Association* **266**,(1991) 1686–1691.
 35. Rangel-Frausto, M. S. The Epidemiology of Bacterial Sepsis *Infectious Disease Clinics of North America* **13**,(1999) 299.
 36. Marsh, C. B., and Wewers, M. D. The Pathogenesis of Sepsis – Factors that Modulate the Response to Gram-Negative Bacterial Infection *Clinics in Chest Medicine* **17**,(1996) 183.
 37. Brandtzaeg, P. Significance and Pathogenesis of Septic Shock *Pathology of Septic Shock* **216**,(1996) 15–37.
 38. Invivogen <http://www.invivogen.com/ressource.php?ID=29>,(2008).
 39. Weiss, J., Elsbach, P., Olsson, I., and Odeberg, H. Purification and Characterization of a Potent Bactericidal and Membrane Active Protein from Granules of Human Polymorphonuclear Leukocytes *Journal of Biological Chemistry* **253**,(1978) 2664–2672.
 40. Tobias, P. S., Soldau, K., and Ulevitch, R. J. Identification of a Lipid A Binding-Site in the Acute Phase Reactant Lipopolysaccharide Binding-Protein *Journal of Biological Chemistry* **264**,(1989) 10867–10871.

41. Ried, C., Wahl, C., Miethke, T., Wellnhofer, G., Landgraf, C., SchneiderMergener, J., and Hoess, A. High Affinity Endotoxin Binding and Neutralizing Peptides Based on the Crystal Structure of Recombinant Limulus Anti-Lipopolysaccharide Factor *Journal of Biological Chemistry* **271**,(1996) 28120-28127.
42. Tobias, P. S., Soldau, K., Iovine, N. M., Elsbach, P., and Weiss, J. Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Proteins BPI and LBP form Different Types of Complexes with LPS *Journal of Biological Chemistry* **272**,(1997) 18682-18685.
43. Yu, B., and Wright, S. D. Catalytic Properties of Lipopolysaccharide (LPS) Binding Protein - Transfer of LPS to Soluble CD14 *Journal of Biological Chemistry* **271**,(1996) 4100-4105.
44. Thomas, C. J., Kapoor, M., Sharma, S., Bausinger, F., Zyilan, U., Lipsker, D., Hanau, D., and Surolia, A. Evidence of a Trimolecular Complex Involving LPS, LPS Binding Protein and Soluble CD14 as an Effector of LPS Response *Febs Letters* **531**,(2002) 184-188.
45. Outschorn, A. S. Characterization of the Usp Reference Standard Endotoxin *Watson, S. W., J. Levin and T. J. Novitsky (Ed.). Progress in Clinical and Biological Research, Vol. 93. Endotoxins and Their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test; Proceedings of an International Conference of Endotoxin Standards and Limulus Amebocyte Lysate Use with Parenteral Drugs, Woods Hole, Mass., USA, September, 1981. Xix+ 417p. Alan R. Liss, Inc.: New York, N.Y., USA. Illus*,(1982) P115-120.
46. Bang, F. B. A Bacterial Disease of Limulus-Polyphemus *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* **98**,(1956) 325-351.
47. Levin, J., and Bang, F. B. Role of Endotoxin in Extracellular Coagulation of Limulus Blood *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* **115**,(1964) 265.
48. Levin, J., and Bang, F. B. Description of Cellular Coagulation in Limulus *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* **115**,(1964) 337.
49. Levin, J., and Bang, F. B. Clottable Protein in Limulus - Its Localization and Kinetics of Its Coagulation by Endotoxin *Thrombosis Et Diathesis Haemorrhagica* **19**,(1968) 186.
50. Solum, N. O. Some Characteristics of Clottable Protein of Limulus-Polyphemus Blood Cells *Thrombosis Et Diathesis Haemorrhagica* **23**,(1970) 170.
51. Solum, N. O. The Coagulogen of Limulus-Polyphemus Hemocytes a Comparison of the Clotted and Nonclotted Forms of the Molecule *Thrombosis Research* **2**,(1973) 55-69.
52. Young, N. S., Levin, J., and Prenderg.Ra Invertebrate Coagulation System Activated by Endotoxin - Evidence for Enzymatic Mediation *Journal of Clinical Investigation* **51**,(1972) 1790.
53. Cooper, J. F., Hochstein, H. D., and Seligmann, E. B. The Limulus Test for Endotoxin (Pyrogen) in Radiopharmaceuticals and Biologicals *Bull Parenter Drug Assoc* **26**,(1972) 153-162.

-
54. Teller, J. D., and Kelly, K. M. A Turbidimetric Limulus Amebocyte Assay for the Quantitative Determination of Gram Negative Bacterial Endotoxin *Prog Clin Biol Res* **29**,(1979) 423-33.
 55. Lindsay, G. K., Roslansky, P. F., and Novitsky, T. J. Single-Step, Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin *Journal of Clinical Microbiology* **27**,(1989) 947-951.
 56. Associates of Cape Cod, Inc. Pyrotell-T Test Procedure.
 57. Associates of Cape Cod, Inc. Pyrochrome Test Procedure.
 58. CAMBREX Bio Science Walkersville, Inc. Pyrogen-5000 Test Procedure
 59. Greisman, S. E., and Hornick, R. B. Comparative Pyrogenic Reactivity of Rabbit and Man to Bacterial Endotoxin *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **131**,(1969) 1154.
 60. Srimal, S., Surolia, N., Balasubramanian, S., and Surolia, A. Titration Calorimetric Studies to Elucidate the Specificity of the Interactions of Polymyxin B with Lipopolysaccharides and Lipid A *Biochemical Journal* **315**,(1996) 679-686.
 61. Thomas, C. J., Gangadhar, B. P., Surolia, N., and Surolia, A. Kinetics and Mechanism of the Recognition of Endotoxin by Polymyxin B *Journal of the American Chemical Society* **120**,(1998) 12428-12434.
 62. Thomas, C. J., Surolia, N., and Surolia, A. Surface Plasmon Resonance Studies Resolve the Enigmatic Endotoxin Neutralizing Activity of Polymyxin B *Journal of Biological Chemistry* **274**,(1999) 29624-29627.
 63. Bruch, M. D., Cajal, Y., Koh, J. T., and Jain, M. K. Higher Order Structure of Polymyxin B: The Functional Significance of Topological Flexibility *Journal of the American Chemical Society* **121**,(1999) 11993-12004.
 64. Tsubery, H., Ofek, I., Cohen, S., and Fridkin, M. The Functional Association of Polymyxin B with Bacterial Lipopolysaccharide is Stereospecific: Studies on Polymyxin B Nonapeptide *Biochemistry* **39**,(2000) 11837-11844.
 65. David, S. A. Towards a Rational Development of Anti-Endotoxin Agents: Novel Approaches to Sequestration of Bacterial Endotoxins with Small Molecules *Journal of Molecular Recognition* **14**,(2001) 370-387.
 66. Yin, N., Marshall, R. L., Matheson, S., and Savage, P. B. Synthesis of Lipid A Derivatives and Their Interactions with Polymyxin B and Polymyxin B Nonapeptide *Journal of the American Chemical Society* **125**,(2003) 2426-2435.
 67. Chapman, T. M., and Golden, M. R. Polymyxin-B Nmr Evidence for a Peptide Antibiotic with Folded Structure in Water *Biochemical and Biophysical Research Communications* **46**,(1972) 2040.
 68. Rustici, A., Velucchi, M., Faggioni, R., Sironi, M., Ghezzi, P., Quataert, S., Green, B., and Porro, M. Molecular Mapping and Detoxification of the Lipid A Binding-Site by Synthetic Peptides *Science* **259**,(1993) 361-365.

69. Battafarano, R. J., Dahlberg, P. S., Ratz, C. A., Johnston, J. W., Gray, B. H., Haseman, J. R., Mayo, K. H., and Dunn, D. L. Peptide Derivatives of 3 Distinct Lipopolysaccharide-Binding Proteins Inhibit Lipopolysaccharide-Induced Tumor-Necrosis-Factor-Alpha Secretion in-Vitro *Surgery* **118**,(1995) 318-324.
70. Kloczewiak, M., Black, K. M., Loiselle, P., Cavaillon, J. M., Wainwright, N., and Warren, H. S. Synthetic Peptides That Mimic the Binding-Site of Horseshoe-Crab Antilipopolysaccharide Factor *Journal of Infectious Diseases* **170**,(1994) 1490-1497.
71. Gray, B. H., Haseman, J. R., and Mayo, K. H. B/Pi-Derived Synthetic Peptides - Synergistic Effects in Tethered Bactericidal and Endotoxin Neutralizing Peptides *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1244**,(1995) 185-190.
72. Pereira, H. A., Erdem, I., Pohl, J., and Spitznagel, J. K. Synthetic Bactericidal Peptide-Based on Cap37 - a 37-Kda Human Neutrophil Granule-Associated Cationic Antimicrobial Protein Chemotactic for Monocytes *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**,(1993) 4733-4737.
73. Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Zahringer, U., Seydel, U., Dipadova, F., Schreier, M., and Brade, H. Bacterial, Endotoxin - Molecular Relationships of Structure to Activity and Function *Faseb Journal* **8**,(1994) 217-225.
74. Baumgartner, J. D., and Calandra, T. Treatment of sepsis - Past and future avenues *Drugs* **57**,(1999) 127-132.
75. Konadu, E., Shiloach, J., Bryla, D. A., Robbins, J. B., and Szu, S. C. Synthesis, Characterization, and Immunological Properties in Mice of Conjugates Composed of Detoxified Lipopolysaccharide of Salmonella Paratyphi A Bound to Tetanus Toxoid, with Emphasis on the Role of O Acetyls *Infection and Immunity* **64**,(1996) 2709-2715.
76. Kossaczka, Z., and Szu, S. C. Evaluation of Synthetic Schemes to Prepare Immunogenic Conjugates of Vibrio Cholerae O139 Capsular Polysaccharide with Chicken Serum Albumin *Glycoconjugate Journal* **17**,(2000) 425-433.
77. Chernyak, A., Kondo, S., Wade, T. K., Meeks, M. D., Alzari, P. M., Fournier, J. M., Taylor, R. K., Kovac, P., and Wade, W. F. Induction of Protective Immunity by Synthetic Vibrio Cholerae Hexasaccharide Derived from V-Cholerae O1 Ogawa Lipopolysaccharide Bound to a Protein Carrier *Journal of Infectious Diseases* **185**,(2002) 950-962.
78. Yu, S. Q., and Gu, X. X. Synthesis and Characterization of Lipooligosaccharide-Based Conjugate Vaccines for Serotype B Moraxella Catarrhalis *Infection and Immunity* **73**,(2005) 2790-2796.
79. Paulovicova, E., Machova, E., Hostacka, A., and Bystricky, S. Immunological Properties of Complex Conjugates Based on Vibrio Cholerae O1 Ogawa Lipopolysaccharide Antigen *Clinical and Experimental Immunology* **144**,(2006) 521-527.

-
80. Al-Zeer, M., and Masoud, H. LPS-Based Conjugate Vaccines Composed of O-Polysaccharide from *Pseudomonas Aeruginosa* IATS 6 and 11 Bound to a Carrier Protein *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **23**,(2007) 1541-1549.
81. Masoud, H. LPS-Based Conjugate Vaccines Composed of Saccharide Antigens of Smooth-Type Salmonella Enteritidis and Rough-Type S. Gallinarum 9R Bound to Bovine Serum Albumin *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **39**,(2007) 315-322.
82. Leturcq, D. J., Moriarty, A. M., Talbott, G., Winn, R. K., Martin, T. R., and Ulevitch, R. J. Antibodies Against CD14 Protect Primates from Endotoxin Induced Shock *Journal of Clinical Investigation* **98**,(1996) 1533-1538.
83. Verbon, A., Meijers, J. C. M., Spek, C. A., Hack, C. E., Pribble, J. P., Turner, T., Dekkers, P. E. P., Axtelle, T., Levi, M., van Deventer, S. J. H., Reitsma, P. H., and van der Poll, T. Effects of IC14, an Anti-CD14 Antibody, on Coagulation and Fibrinolysis During Low-Grade Endotoxemia in Humans *Journal of Infectious Diseases* **187**,(2003) 55-61.
84. Mancuso, G., Midiri, A., Biondo, C., Beninati, C., Gambuzza, M., Macri, D., Bellantoni, A., Weintraub, A., Espevik, T., and Teti, G. Bacteroides Fragilis Derived Lipopolysaccharide Produces Cell Activation and Lethal Toxicity via Toll-Like Receptor 4 *Infection and Immunity* **73**,(2005) 5620-5627.
85. Daubeuf, B., Mathison, J., Spiller, S., Hugues, S., Herren, S., Ferlin, W., Kosco-Vilbois, M., Wagner, H., Kirschning, C. J., Ulevitch, R., and Elson, G. TLR4/MD-2 Monoclonal Antibody Therapy Affords Protection in Experimental Models of Septic Shock *Journal of Immunology* **179**,(2007) 6107-6114.
86. Gallay, P., Heumann, D., Leroy, D., Barras, C., and Glauser, M. P. Mode of Action of Anti-Lipopolysaccharide-Binding Protein Antibodies for Prevention of Endotoxemic Shock in Mice *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**,(1994) 7922-7926.
87. Weiss, J., Muello, K., Victor, M., and Elsbach, P. The Role of Lipopolysaccharides in the Action of the Bactericidal Permeability-Increasing Neutrophil Protein on the Bacterial Envelope *Journal of Immunology* **132**,(1984) 3109-3115.
88. Ooi, C. E., Weiss, J., Doerfler, M. E., and Elsbach, P. Endotoxin-Neutralizing Properties of the 25-Kd N-Terminal Fragment and a Newly Isolated 30-Kd C-Terminal Fragment of the 55-60-Kd Bactericidal Permeability-Increasing Protein of Human Neutrophils *Journal of Experimental Medicine* **174**,(1991) 649-655.
89. Wiese, A., Brandenburg, K., Lindner, B., Schromm, A. B., Carroll, S. F., Rietschel, E. T., and Seydel, U. Mechanisms of Action of the Bactericidal/Permeability-Increasing Protein BPI on Endotoxin and Phospholipid Monolayers and Aggregates *Biochemistry* **36**,(1997) 10301-10310.
90. Spitznagel, J. K., Pereira, H. A., Martin, L. E., Guzman, G. S., and Shafer, W. M. A Monoclonal-Antibody That Inhibits the Antimicrobial Action of a 57-Kd Cationic Protein of Human Polymorphonuclear Leukocytes *Journal of Immunology* **139**,(1987) 1291-1296.

91. Pereira, H. A., Spitznagel, J. K., Winton, E. F., Shafer, W. M., Martin, L. E., Guzman, G. S., Pohl, J., Scott, R. W., Marra, M. N., and Kinkade, J. M. The Ontogeny of a 57-Kd Cationic Antimicrobial Protein of Human Polymorphonuclear Leukocytes – Localization to a Novel Granule Population *Blood* **76**,(1990) 825–834.
92. Pereira, H. A., Spitznagel, J. K., Pohl, J., Wilson, D. E., Morgan, J., Palings, I., and Larrick, J. W. Cap-37, a 37-Kd Human Neutrophil Granule Cationic Protein Shares Homology with Inflammatory Proteinases *Life Sciences* **46**,(1990) 189–196.
93. Pohl, J., Pereira, H. A., Martin, N. M., and Spitznagel, J. K. Amino-Acid-Sequence of Cap37, a Human Neutrophil Granule-Derived Antibacterial and Monocyte-Specific Chemotactic Glycoprotein Structurally Similar to Neutrophil Elastase *Febs Letters* **272**,(1990) 200–204.
94. Ohno, N., and Morrison, D. C. Effects of Lipopolysaccharide Chemotype Structure on Binding and Inactivation of Hen Egg Lysozyme *European Journal of Biochemistry* **186**,(1989) 621–627.
95. Ohno, N., and Morrison, D. C. Lipopolysaccharide Interactions with Lysozyme Differentially Affect Lipopolysaccharide Immunostimulatory Activity *European Journal of Biochemistry* **186**,(1989) 629–636.
96. Ohno, N., and Morrison, D. C. Lipopolysaccharide Interaction with Lysozyme – Binding of Lipopolysaccharide to Lysozyme and Inhibition of Lysozyme Enzymatic-Activity *Journal of Biological Chemistry* **264**,(1989) 4434–4441.
97. Ohno, N., Tanida, N., and Yadomae, T. Characterization of Complex-Formation between Lipopolysaccharide and Lysozyme *Carbohydrate Research* **214**,(1991) 115–130.
98. Molloy, A. L., and Winterbourn, C. C. Release of Iron from Phagocytosed Escherichia-Coli and Uptake by Neutrophil Lactoferrin *Blood* **75**,(1990) 984–989.
99. Miyazawa, K., Mantel, C., Lu, L., Morrison, D. C., and Broxmeyer, H. E. Lactoferrin-Lipopolysaccharide Interactions – Effect on Lactoferrin Binding to Monocyte Macrophage-Differentiated HL-60 Cells *Journal of Immunology* **146**,(1991) 723–729.
100. Orsi, N. The Antimicrobial Activity of Lactoferrin: Current Status and Perspectives *Biometals* **17**,(2004) 189–196.
101. Vaara, M. Agents That Increase the Permeability of the Outer-Membrane *Microbiological Reviews* **56**,(1992) 395–411.
102. Le-Barillec, K., Pidard, D., Balloy, V., and Chignard, M. Human Neutrophil Cathepsin G Down Regulates LPS Mediated Monocyte Activation Through CD14 Proteolysis *Journal of Leukocyte Biology* **68**,(2000) 209–215.
103. de Haas, C. J. C., Poppelier, M., van Kessel, K. P. M., and van Strijp, J. A. G. Serum Amyloid P Component Prevents High Density Lipoprotein Mediated Neutralization of Lipopolysaccharide *Infection and Immunity* **68**,(2000) 4954–4960.

-
104. Levels, J. H. M., Abraham, P. R., van den Ende, A., and van Deventer, S. J. H. Distribution and Kinetics of Lipoprotein Bound Endotoxin *Infection and Immunity* **69**,(2001) 2821–2828.
105. Warren, H. S., Glennon, M. L., Wainwright, N., Amato, S. F., Black, K. M., Kirsch, S. J., Riveau, G. R., Whyte, R. I., Zapol, W. M., and Novitsky, T. J. Binding and Neutralization of Endotoxin by Limulus Antilipopolysaccharide Factor *Infection and Immunity* **60**,(1992) 2506–2513.
106. Hoess, A., Watson, S., Siber, G. R., and Liddington, R. Crystal-Structure of an Endotoxin-Neutralizing Protein from the Horseshoe-Crab, Limulus Anti-Lps Factor, at 1.5 Angstrom Resolution *Embo Journal* **12**,(1993) 3351–3356.
107. Wainwright, N. R., and Novitsky, T. J. (1998), pp. 493, Associates of Cape Cod, Inc. US 5747455
108. Ding, J. L., and Ho, B. Antimicrobial Peptides: Resistant-Proof Antibiotics of the New Millennium *Drug Development Research* **62**,(2004) 317–335.
109. Morrison, D. C., and Jacobs, D. M. Binding of Polymyxin B to Lipid A Portion of Bacterial Lipopolysaccharides *Immunochemistry* **13**,(1976) 813–818.
110. David, S. A., Balasubramanian, K. A., Mathan, V. I., and Balaram, P. Analysis of the Binding of Polymyxin B to Endotoxic Lipid A and Core Glycolipid Using a Fluorescent Displacement Probe *Biochimica Et Biophysica Acta* **1165**,(1992) 147–152.
111. Cajal, Y., Rogers, J., Berg, O. G., and Jain, M. K. Intermembrane Molecular Contacts by Polymyxin B Mediate Exchange of Phospholipids *Biochemistry* **35**,(1996) 299–308.
112. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. Molecular Biology of the Cell, 2nd Edition *Garland Publishing, New York*,(1989).
113. Davies, C. The Immunoassay Handbook 2nd edition *Nature Publishing Group, New York*,(2001).
114. Jayasena, S. D. Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics *Clinical Chemistry* **45**,(1999) 1628–1650.
115. Tombelli, S., Minunni, A., and Mascini, A. Analytical Applications of Aptamers *Biosensors & Bioelectronics* **20**,(2005) 2424–2434.
116. Du, G. Q., Lin, C., and Bocarsly, A. B. Electroanalytical Detection of Glucose Using a Cyanometalate Modified Electrode: Requirements for the Oxidation of Buried Redox Sites in Glucose Oxidase *Analytical Chemistry* **68**,(1996) 796–806.
117. Heller, A. Electrical Wiring of Redox Enzymes *Accounts of Chemical Research* **23**,(1990) 128–134.
118. Heller, A. Electrical Connection of Enzyme Redox Centers to Electrodes *Journal of Physical Chemistry* **96**,(1992) 3579–3587.
119. McLean, M. A., Stayton, P. S., and Sligar, S. G. Engineering Protein Orientation at Surfaces to Control Macromolecular Recognition Events *Analytical Chemistry* **65**,(1993) 2676–2678.

120. Blonder, R., Katz, E., Cohen, Y., Itzhak, N., Riklin, A., and Willner, I. Application of Redox Enzymes for Probing the Antigen-Antibody Association at Monolayer Interfaces: Development of Amperometric Immunosensor Electrodes *Analytical Chemistry* **68**,(1996) 3151-3157.
121. Schmidt, H. L., and Schuhmann, W. Reagentless Oxidoreductase Sensors *Biosensors & Bioelectronics* **11**,(1996) 127-135.
122. Priano, G. Tesis Doctoral: Detección de Endotoxinas. Bases para un Ensayo de Reconocimiento Molecular *Universidad de Buenos Aires, Argentina*,(2006).
123. Yamazaki, I., and Nakajima, R. Physico-Chemical Comparison between Horseradish Peroxidases A and C *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, Greppin, H., Penel, C., and Gaspar, Th., Eds., *Université de Genève, Geneva*,(1986) 71.
124. Yamazaki, I., Nakajima, R., Honma, H., and Tamura, M. Cyanide as a Possible Ligand of Low-Spin Peroxidases in Plant Tissues *Biochemical and Biophysical Research Communications* **27**,(1967) 53.
125. Ogawa, S., Shiro, Y., and Morishima, I. Calcium Binding by Horseradish Peroxidase C and the Heme Environmental Structure *Biochemical and Biophysical Research Communications* **90**,(1979) 674-678.
126. Everse, J., Everse, K. E., and Grisham, M. B. Peroxidases in Chemistry and Biology *CRC press, Boca Raton, Florida* **II**,(2000).
127. Dunford, H. B. Peroxidases in Chemistry and Biology *CRC press, Boca Raton, Florida* **II**,(1991).
128. Dequaire, M., Limoges, B., Moiroux, J., and Savéant, J. M. Mediated Electrochemistry of Horseradish Peroxidase. Catalysis and Inhibition *Journal of the American Chemical Society* **124**,(2002) 240-253.
129. Wang, D. L., and Heller, A. Miniaturized Flexible Amperometric Lactate Probe *Analytical Chemistry* **65**,(1993) 1069-1073.
130. Sakai, H., Baba, R., Hashimoto, K., Fujishima, A., and Heller, A. Local Detection of Photoelectrochemically Produced H₂O₂ with a Wired Horseradish-Peroxidase Microsensor *Journal of Physical Chemistry* **99**,(1995) 11896-11900.
131. Zhang, Y. C., Kim, H. H., and Heller, A. Enzyme-Amplified Amperometric Detection of 3000 Copies of DNA in a 10 μ L Droplet at 0.5 fM Concentration *Analytical Chemistry* **75**,(2003) 3267-3269.
132. Bongiovanni, C., Ferri, T., Poscia, A., Varalli, M., Santucci, R., and Desideri, A. An Electrochemical Multienzymatic Biosensor for Determination of Cholesterol *Bioelectrochemistry* **54**,(2001) 17-22.
133. Logan, T. C., Clark, D. S., Stachowiak, T. B., Svec, F., and Frechet, J. M. J. Photopatterning Enzymes on Polymer Monoliths in Microfluidic Devices for Steady State Kinetic Analysis and Spatially Separated Multi-Enzyme Reactions *Analytical Chemistry* **79**,(2007) 6592-6598.

-
134. Shiku, H., Hara, Y., Matsue, T., Uchida, I., and Yamauchi, T. Dual Immunoassay of Human Chorionic Gonadotropin and Human Placental Lactogen at a Microfabricated Substrate by Scanning Electrochemical Microscopy *Journal of Electroanalytical Chemistry* **438**,(1997) 187–190.
135. Tan, F., Yan, F., and Ju, H. X. Sensitive Reagentless Electrochemical Immunosensor Based on an Ormosil Sol-Gel Membrane for Human Chorionic Gonadotrophin *Biosensors & Bioelectronics* **22**,(2007) 2945–2951.
136. Angus, D. C., Linde-Zwirble, W. T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., and Pinsky, M. R. Epidemiology of Severe Sepsis in the United States: Analysis of Incidence, Outcome, and Associated Costs of Care *Critical Care Medicine* **29**,(2001) 1303–1310.
137. Ulevitch, R. J. Recognition of Bacterial-Endotoxins by Receptor-Dependent Mechanisms *Advances in Immunology, Vol 53* **53**,(1993) 267–289.
138. Roslansky, P. F., and Novitsky, T. J. Sensitivity of Limulus Amebocyte Lysate (Lal) to Lal-Reactive Glucans *Journal of Clinical Microbiology* **29**,(1991) 2477–2483.
139. Chan, S., Horner, S. R., Fauchet, P. M., and Miller, B. L. Identification of Gram Negative Bacteria Using Nanoscale Silicon Microcavities *Journal of the American Chemical Society* **123**,(2001) 11797–11798.
140. Voss, S., Fischer, R., Jung, G., Wiesmuller, K. H., and Brock, R. A Fluorescence-Based Synthetic LPS Sensor *Journal of the American Chemical Society* **129**,(2007) 554–561.
141. Ong, K. G., Leland, J. M., Zeng, K. F., Barrett, G., Zourob, M., and Grimes, C. A. A Rapid Highly Sensitive Endotoxin Detection System *Biosensors & Bioelectronics* **21**,(2006) 2270–2274.
142. Ong, K. G., Mungle, C. S., and Grimes, C. A. Control of a Magnetoelastic Sensor Temperature Response by Magnetic Field Tuning *Ieee Transactions on Magnetics* **39**,(2003) 3319–3321.
143. Jain, M. K., and Grimes, C. A. Effect of Surface Roughness on Liquid Property Measurements Using Mechanically Oscillating Sensors *Sensors and Actuators a-Physical* **100**,(2002) 63–69.
144. Kilar, A., Kocsis, B., Kustos, I., Kilar, F., and Hjerten, S. CE to Monitor Endotoxins by Protein Complexation *Electrophoresis* **27**,(2006) 4188–4195.
145. Kilar, A., Farkas, V., Kovacs, K., Kocsis, B., and Kilar, F. Novel Quantitative Electrophoretic Analysis of Endotoxins on Microchips *Electrophoresis* **29**,(2008) 1713–1722.
146. Binding, N., Jaschinski, S., Werlich, S., Bletz, S., and Witting, U. Quantification of Bacterial Lipopolysaccharides (Endotoxin) by GC-MS Determination of 3-Hydroxy Fatty Acids *Journal of Environmental Monitoring* **6**,(2004) 65–70.
147. Kato, D., Iijima, S., Kurita, R., Sato, Y., Jia, J. B., Yabuki, S., Mizutani, F., and Niwa, O. Electrochemically Amplified Detection for Lipopolysaccharide Using Ferrocenylboronic Acid *Biosensors & Bioelectronics* **22**,(2007) 1527–1531.

148. Priano, G., and Battaglini, F. Use of an Antimicrobial Protein for Endotoxin Detection in a Competitive Electrochemical Assay *Analytical Chemistry* **77**,(2005) 4976–4984.
149. U.S. Pharmacopoeia **26**,(2002–2003).
150. Association for the Advancement of Medical Instrumentation: American National Standard; Water Treatment Equipment for Hemodialysis Applications. ANSI/AAMI RD62, Arlington, VA,(2001).
151. Troelstra, A., Antal-Szalmas, P., De Graaf-Miltenburg, L. A. M., Weersink, A. J. L., Verhoef, J., Van Kessel, K. P. M., and Van Strijp, J. A. G. Saturable CD14-Dependent Binding of Fluorescein-Labeled Lipopolysaccharide to Human Monocytes *Infection and Immunity* **65**,(1997) 2272–2277.
152. Tobias, P. S., Soldau, K., Gegner, J. A., Mintz, D., and Ulevitch, R. J. Lipopolysaccharide Binding Protein-Mediated Complexation of Lipopolysaccharide with Soluble CD14 *Journal of Biological Chemistry* **270**,(1995) 10482–10488.
153. Luk, J. M., Kumar, A., Tsang, R., and Staunton, D. Biotinylated Lipopolysaccharide Binds to Endotoxin Receptor in Endothelial and Monocytic Cells *Analytical Biochemistry* **232**,(1995) 217–224.
154. Gudipati, C. S., Finlay, J. A., Callow, J. A., Callow, M. E., and Wooley, K. L. The Antifouling and Fouling Release Performance of Hyperbranched Fluoropolymer (HBFP)-Poly(ethylene glycol) (PEG) Composite Coatings Evaluated by Adsorption of Biomacromolecules and the Green Fouling Alga *Ulva Langmuir* **21**,(2005) 3044–3053.
155. Mieszala, M., Kogan, G., and Jennings, H. J. Conjugation of Meningococcal Lipooligosaccharides Through their Lipid A Terminus Conserves their Inner Epitopes and Results in Conjugate Vaccines Having Improved Immunological Properties *Carbohydrate Research* **338**,(2003) 167–175.
156. Cox, A. D., Zou, W., Gidney, M. A. J., Lacelle, S., Plested, J. S., Makepeace, K., Wright, J. C., Coull, P. A., Moxon, E. R., and Richards, J. C. Candidacy of LPS-Based Glycoconjugates to Prevent Invasive Meningococcal Disease: Developmental Chemistry and Investigation of Immunological Responses Following Immunization of Mice and Rabbits *Vaccine* **23**,(2005) 5045–5054.
157. Ulevitch, R. J. The Preparation and Characterization of a Radioiodinated Bacterial Lipopolysaccharide *Molecular Immunology* **15**,(1978) 157–164.
158. Zlydaszyk, J. C., and Moon, R. J. Fate of ⁵¹Cr Labeled Lipopolysaccharide in Tissue Culture Cells and Livers of Normal Mice *Infection and Immunity* **14**,(1976) 100–105.
159. Munford, R. S., DeVaux, L. C., Cronan Jr, J. E., and Rick, P. D. Biosynthetic Radiolabeling of Bacterial Lipopolysaccharide to High Specificity Activity *Journal of Immunological Methods* **148**,(1992) 115–120.
160. Wollenweber, H. W., and Morrison, D. C. Synthesis and Biochemical Characterization of a Photoactivatable, Iodinatable, Cleavable Bacterial Lipopolysaccharide Derivative *Journal of Biological Chemistry* **260**,(1985) 15068–15074.

-
161. Triantafilou, M., Triantafilou, K., and Fernandez, N. Rough and Smooth Forms of Fluorescein-Labelled Bacterial Endotoxin Exhibit CD14/LBP Dependent and Independent Binding that is Influenced by Endotoxin Concentration *European Journal of Biochemistry* **267**,(2000) 2218–2226.
162. Triantafilou, K., Triantafilou, M., and Fernandez, N. Lipopolysaccharide (LPS) Labeled with Alexa 488 Hydrazide as a Novel Probe for LPS Binding Studies *Cytometry* **41**,(2000) 316–320.
163. Nygren, H., and Dahlen, G. Ultrastructural Localisation of Lipopolysaccharide Binding Sites with Peroxidase Conjugated Lipopolysaccharides *Journal of Immunological Methods* **25**,(1979) 355–364.
164. Priano, G., Pallarola, D., and Battaglini, F. Endotoxin Detection in a Competitive Electrochemical Assay: Synthesis of a Suitable Endotoxin Conjugate *Analytical Biochemistry* **362**,(2007) 108–116.
165. Bard, A. J., and Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications* 2nd Edition *Wiley & Sons Inc.: New York*,(2001).
166. Pletcher, R., Greef, R., Peat, R., and Peter, L. M. *Instrumental Methods in Electrochemistry* *Southampton Electrochemistry Group, University of Southampton, Horwood Publishing, Chemical Science Series, England*,(2001).
167. Bard, A. J., and Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications* 2nd Edition *Wiley & Sons Inc.: New York*,(2001) Capitulo 5.
168. Bard, A. J., and Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications* 2nd Edition *Wiley & Sons Inc.: New York*,(2001) Capitulo 6.
169. Nicholson, R. S., and Shain, I. Theory of Stationary Electrode Polarography: Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems *Analytical Chemistry* **36**,(1964) 706–723.
170. Bard, A. J., and Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications* 2nd Edition *Wiley & Sons Inc.: New York*,(2001) Capitulo 7.
171. Presnova, G., Grigorenko, V., Egorov, A., Ruzgas, T., Lindgren, A., Gorton, L., and Borchers, T. Direct Heterogeneous Electron Transfer of Recombinant Horseradish Peroxidases on Gold *Faraday Discussions* **116**,(2000) 281–289.
172. Hobara, D., Uno, Y., and Kakiuchi, T. Immobilization of Horseradish Peroxidase on Nanometre-Scale Domains of Binary Self-Assembled Monolayers Formed from Dithiobis-N-Succinimidyl Propionate and 1-Tetradecanethiol on Au(111) *Physical Chemistry Chemical Physics* **3**,(2001) 3437–3441.
173. Albery, W. J., Bartlett, P. N., Driscoll, B. J., and Lennox, R. B. Amperometric Enzyme Electrodes .5. the Homogeneous Mediated Mechanism *Journal of Electroanalytical Chemistry* **323**,(1992) 77–102.

174. Bartlett, P. N., Tebbutt, P., and Tyrrell, C. H. Electrochemical Immobilization of Enzymes. 3. Immobilization of Glucose-Oxidase in Thin-Films of Electrochemically Polymerized Phenols *Analytical Chemistry* **64**,(1992) 138-142.
175. Limoges, B., Saveant, J. M., and Yazidi, D. Quantitative Analysis of Catalysis and Inhibition at Horseradish Peroxidase Monolayers Immobilized on an Electrode Surface *Journal of the American Chemical Society* **125**,(2003) 9192-9203.
176. Micromass <http://www.micromass.co.uk>,(1997).
177. Harvey, D. J. Analysis of Carbohydrates and Glycoconjugates by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: An Update Covering the Period 1999-2000 *Mass Spectrometry Reviews* **25**,(2006) 595-662.
178. Harvey, D. J. Analysis of Carbohydrates and Glycoconjugates by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: An Update Covering the Period 2001-2002 *Mass Spectrometry Reviews* **27**,(2008) 125-201.
179. Karas, M., and Hillenkamp, F. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons *Analytical Chemistry* **60**,(1988) 2299-2301.
180. Karas, M., Gluckmann, M., and Schafer, J. Ionization in Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization: Singly Charged Molecular Ions Are the Lucky Survivors *Journal of Mass Spectrometry* **35**,(2000) 1-12.
181. Kruger, R., Pfenninger, A., Fournier, I., Gluckmann, M., and Karas, M. Analyte Incorporation and Ionization in Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Visualized by pH Indicator Molecular Probes *Analytical Chemistry* **73**,(2001) 5812-5821.
182. Karas, M., Bahr, U., Fournier, I., Gluckmann, M., and Pfenninger, A. The Initial Ion Velocity as a Marker for Different Desorption Ionization Mechanisms in MALDI *International Journal of Mass Spectrometry* **226**,(2003) 239-248.
183. Knochenmuss, R., and Zhigilei, L. V. Molecular Dynamics Model of Ultraviolet Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Including Ionization Processes *Journal of Physical Chemistry B* **109**,(2005) 22947-22957.
184. Horneffer, V., Gluckmann, M., Kruger, B., Karas, M., Strupat, K., and Hillenkamp, F. Matrix-Analyte-Interaction in MALDI-MS: Pellet and Nano-Electrospray Preparations *International Journal of Mass Spectrometry* **249**,(2006) 426-432.
185. Yamamura, H. I. Methods in Neurotransmitter Receptor Analysis *Raven Press*,(1990).
186. Kenakin, T. Pharmacologic Analysis of Drug Receptor Interaction 2nd Edition *Raven Press*,(1993).
187. Limbird, L. E. Cell Surface Receptors: A Short Course on Theory and Methods 2nd Edition *Kluwer Academic Publishers*,(1996).
188. Zettner, A. Principles of Competitive Binding Assays (Saturation Analyses) .1. Equilibrium Techniques *Clinical Chemistry* **19**,(1973) 699-705.
189. Priano, G., Gonzalez, G., Günther, M., and Battaglini, F. Disposable Gold electrode Array for Simultaneous Electrochemical Studies *Electroanalysis* **20**,(2008) 91-97.

-
190. Lüderitz, O., Staub, A. M., and Westphal, O. Immunochemistry of O and R Antigens of Salmonella and Related Enterobacteriaceae *Bacteriological Reviews* **30**,(1966) 192-255.
191. Westphal, O., and Jann, K. Methods in Carbohydrate Chemistry (*edited by R. L. Whistler*), Academic Press, New York **5**,(1965) 83-91.
192. Hickman, J., and Ashwell, G. Isolation of a Bacterial Lipopolysaccharide from Xanthomonas Campestris Containing 3-Acetamido-3,6-Dideoxy-D-Galactose and D-Rhamnose *Journal of Biological Chemistry* **241**,(1966) 1424-1428.
193. Raff, R. A., and Wheat, R. W. Carbohydrate Composition of Phenol-Soluble Lipopolysaccharides of Citrobacter Freundii *Journal of Bacteriology* **95**,(1968) 2035-2043.
194. Brade, H., and Galanos, C. Isolation, Purification, and Chemical Analysis of the Lipopolysaccharide and Lipid-A of Acinetobacter Calcoaceticus Nctc 10305 *European Journal of Biochemistry* **122**,(1982) 233-237.
195. Goldman, R. C., and Leive, L. Heterogeneity of Antigenic-Side-Chain Length in Lipopolysaccharide from Escherichia-Coli-0111 and Salmonella-Typhimurium-Lt2 *European Journal of Biochemistry* **107**,(1980) 145-153.
196. Inzana, T. J., and Apicella, M. A. Use of a Bilayer Stacking Gel to Improve Resolution of Lipopolysaccharides and Lipooligosaccharides in Polyacrylamide Gels *Electrophoresis* **20**,(1999) 462-465.
197. Volpi, N. Separation of Escherichia Coli 055 : B5 Lipopolysaccharide and Detoxified Lipopolysaccharide by High-Performance Capillary Electrophoresis *Electrophoresis* **24**,(2003) 3097-3103.
198. Pupo, E., and Hardy, E. Isolation of Smooth-Type Lipopolysaccharides to Electrophoretic Homogeneity *Electrophoresis* **28**,(2007) 2351-2357.
199. Morrison, D. C., and Leive, L. Fractions of Lipopolysaccharide from Escherichia-Coli O111-B4 Prepared by 2 Extraction Procedures *Journal of Biological Chemistry* **250**,(1975) 2911-2919.
200. Cheng, J. J., Yang, C. J., Cheng, C. H., Wang, Y. T., Huang, N. K., and Lu, M. K. Characterization and Functional Study of Antridia Camphorata Lipopolysaccharide *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**,(2005) 469-474.
201. Somlyo, B., Kovats, E., Keler, T., and Nowotny, A. Column Liquid-Chromatography of Endotoxins *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* **525**,(1990) 329-338.
202. Fischer, W. Molecular Analysis of Lipid Macroamphiphiles by Hydrophobic Interaction Chromatography *Journal of Microbiological Methods* **25**,(1996) 129-144.
203. Bradford, M. M. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding *Analytical Biochemistry* **72**,(1976) 248-254.
204. Bergethon, P. The Physical Basis of Biochemistry, Springer-Verlag, New York,(1998) 254-256.

205. Lee, C. H., and Tsai, C. M. Quantification of Bacterial Lipopolysaccharides by the Purpald Assay: Measuring Formaldehyde Generated from 2-Keto-3-deoxyoctonate and Heptose at the Inner Core by Periodate Oxidation *Analytical Biochemistry* **267**,(1999) 161-168.
206. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 *Nature* **227**,(1970) 680-685.
207. Tsai, C. M., and Frasch, C. E. A Sensitive Silver Stain for Detecting Lipopolysaccharides in Polyacrylamide Gels *Analytical Biochemistry* **119**,(1982) 115-119.
208. Hattori, M., Nagasawa, K., Ametani, A., Kaminogawa, S., and Takahashi, K. Functional Changes in b-Lactoglobulin by Conjugation with Carboxymethyl Dextran *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**,(1994) 2120-2125.
209. Kobayashi, K., Yoshida, T., Takahashi, K., and Hattori, M. Modulation of the T Cell Response to b-Lactoglobulin by Conjugation with Carboxymethyl Dextran *Bioconjugate Chemistry* **14**,(2003) 168-176.
210. Hirayama, K., Akashi, S., Furuya, M., and Fukuhara, K. Rapid Confirmation and Revision of the Primary Structure of Bovine Serum Albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS *Biochemical and Biophysical Research Communications* **173**,(1990) 639-646.
211. Chance, B., and Maehly, A. C. Methods in Enzymology *Academic Press, London, New York* **II**,(1955) 773-775.
212. Finklea, H. O., Snider, D. A., and Fedyk, J. Passivation of Pinholes in Octadecanethiol Monolayers on Gold Electrodes by Electrochemical Polymerization of Phenol *Langmuir* **6**,(1990) 371-376.
213. Hoogvliet, J. C., Dijkma, M., Kamp, B., and van Bennekom, W. P. Electrochemical Pretreatment of Polycrystalline Gold Electrodes to Produce a Reproducible Surface Roughness for Self Assembly: A Study in Phosphate Buffer pH 7.4 *Analytical Chemistry* **72**,(2000) 2016-2021.
214. Senaratne, W., Andruzzi, L., and Ober, C. K. Self-Assembled Monolayers and Polymer Brushes in Biotechnology: Current Applications and Future Perspectives *Biomacromolecules* **6**,(2005) 2427-2448.
215. Bi, H., Zhong, W., Meng, S., Kong, J., Yang, P., and Liu, B. Construction of a Biomimetic Surface on Microfluidic Chips for Biofouling Resistance *Analytical Chemistry* **78**,(2006) 3399-3405.
216. Wang, A. J., Xu, J. J., and Chen, H. Y. Nonionic Surfactant Dynamic Coating of Poly(dimethylsiloxane) Channel Surface for Microchip Electrophoresis of Amino Acids *Analytica Chimica Acta* **569**,(2006) 188-194.
217. Liu, J. K., Sun, X. F., and Lee, M. L. Surface Reactive Acrylic Copolymer for Fabrication of Microfluidic Devices *Analytical Chemistry* **77**,(2005) 6280-6287.
218. Uchida, K., Otsuka, H., Kaneko, M., Kataoka, K., and Nagasaki, Y. A Reactive Poly(Ethylene Glycol) Layer to Achieve Specific Surface Plasmon Resonance Sensing

- with a High S/N Ratio: The Substantial Role of a Short Underbrushed PEG Layer in Minimizing Nonspecific Adsorption *Analytical Chemistry* **77**, (2005) 1075–1080.
219. Takayama, K., Din, Z. Z., Mukerjee, P., Cooke, P. H., and Kirkland, T. N. Physicochemical Properties of the Lipopolysaccharide Unit That Activates Lymphocytes-B *Journal of Biological Chemistry* **265**, (1990) 14023–14029.
 220. Osterberg, E., Bergstrom, K., Holmberg, K., Riggs, J. A., Vanalstine, J. M., Schuman, T. P., Burns, N. L., and Harris, J. M. Comparison of Polysaccharide and Poly(Ethylene Glycol) Coatings for Reduction of Protein Adsorption on Polystyrene Surfaces *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **77**, (1993) 159–169.
 221. Delgado, A. D., Leonard, M., and Dellacherie, E. Surface Properties of Polystyrene Nanoparticles Coated with Dextrans and Dextran-PEO Copolymers. Effect of Polymer Architecture on Protein Adsorption *Langmuir* **17**, (2001) 4386–4391.
 222. Löfas, S., and Johnsson, B. A Novel Hydrogel Matrix on Gold Surfaces in Surface-Plasmon Resonance Sensors for Fast and Efficient Covalent Immobilization of Ligands *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, (1990) 1526–1528.
 223. Johnsson, B., Löfas, S., and Lindquist, G. Immobilization of Proteins to a Carboxymethyl-dextran-Modified Gold Surface for Biospecific Interaction Analysis in Surface-Plasmon Resonance Sensors *Analytical Biochemistry* **198**, (1991) 268–277.
 224. Rogan, G. J., Dudin, Y. A., Lee, T. C., Magin, K. M., Astwood, J. D., Bhakta, N. S., Leach, J. N., Sanders, P. R., and Fuchs, R. L. Immunodiagnostic Methods for Detection of 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase in Roundup Ready (R) Soybeans *Food Control* **10**, (1999) 407–414.
 225. Robinson, S. A., and Rosenzweig, S. A. Synthesis and Characterization of Biotinylated Forms of Insulin-Like Growth Factor-1: Topographical Evaluation of the IGF-2/IGFBP-2 and IGFBP-3 Interface *Biochemistry* **43**, (2004) 11533–11545.
 226. Kober, E. M., Caspar, J. V., Sullivan, B. P., and Meyer, T. J. Synthetic Routes to New Polypyridyl Complexes of Osmium(II) *Inorganic Chemistry* **27**, (1988) 4587–4598.
 227. Bard, A. J., and Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications* 2nd Edition, (2001) 166–168.
 228. Bohmer, M. R., Koopal, L. K., Janssen, R., Lee, E. M., Thomas, R. K., and Rennie, A. R. Adsorption of Nonionic Surfactants on Hydrophilic Surfaces - an Experimental and Theoretical-Study on Association in the Adsorbed Layer *Langmuir* **8**, (1992) 2228–2239.
 229. Tiberg, F. Physical Characterization of Non-Ionic Surfactant Layers Adsorbed at Hydrophilic and Hydrophobic Solid Surfaces by Time-Resolved Ellipsometry *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions* **92**, (1996) 531–538.
 230. Cullen, D. C., Brown, R. G. W., and Lowe, C. R. Detection of Immuno Complex Formation Via Surface Plasmon Resonance on Gold Coated Diffraction Gratings *Biosensors* **3**, (1987) 211–225.

231. Lu, H. C., Chen, H. M., Lin, Y. S., and Lin, J. W. A Reusable and Specific Protein A-Coated Piezoelectric Biosensor for Flow Injection Immunoassay *Biotechnology Progress* **16**,(2000) 116-124.
232. Ostuni, E., Chapman, R. G., Liang, M. N., Meluleni, G., Pier, G., Ingber, D. E., and Whitesides, G. M. Self-Assembled Monolayers that Resist the Adsorption of Proteins and the Adhesion of Bacterial and Mammalian Cells *Langmuir* **17**,(2001) 6336-6343.
233. Bergstrom, J., Johnsson, B., Bergstroem, J., and Löfas, S., pp. 589867-A1; Pharmacia Ab (Phaa) Pharmacia Biosensor Ab (Phaa).
234. Walczak, M. M., Popenoe, D. D., Deinhammer, R. S., Lamp, B. D., Chung, C., and Porter, M. D. Reductive Desorption of Alkanethiolate Monolayers at Gold: A Measure of Surface Coverage *Langmuir* **7**,(1991) 2687-2693.
235. Walczak, M. M., Alves, C. A., Lamp, B. D., and Porter, M. D. Electrochemical and X-Ray Photoelectron Spectroscopic Evidence for Differences in the Binding-Sites of Alkanethiolate Monolayers Chemisorbed at Gold *Journal of Electroanalytical Chemistry* **396**,(1995) 103-114.
236. El-Deab, M. S., and Ohsaka, T. Molecular Level Design of Binary Self Assembled Monolayers on Polycrystalline Gold Electrodes *Electrochimica Acta* **49**,(2004) 2189-2194.
237. Raiber, K., Terfort, A., Benndorf, C., Krings, N., and Strehblow, H. H. Removal of Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Gold by Plasma Cleaning *Surface Science* **595**,(2005) 56-63.
238. Chapman, R. G., Ostuni, E., Liang, M. N., Meluleni, G., Kim, E., Yan, L., Pier, G., Warren, H. S., and Whitesides, G. M. Polymeric Thin Films that Resist the Adsorption of Proteins and the Adhesion of Bacteria *Langmuir* **17**,(2001) 1225-1233.
239. Osterberg, E., Bergstrom, K., Holmberg, K., Schuman, T. P., Riggs, J. A., Burns, N. L., Vanalstine, J. M., and Harris, J. M. Protein-Rejecting Ability of Surface-Bound Dextran in End-On and Side-On Configurations - Comparison to Peg *Journal of Biomedical Materials Research* **29**,(1995) 741-747.
240. Piehler, J., Brecht, A., Hehl, K., and Gauglitz, G. Protein Interactions in Covalently Attached Dextran Layers *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **13**,(1999) 325-336.
241. Novitsky, T. J., Ridge, R. J., and Sloyer, J. L. (2001), Associates of Cape Cod, Inc., Falmouth, MA, USA.
242. Visintin, A., Latz, E., Monks, B. G., Espevik, T., and Golenbock, D. T. Lysines 128 and 132 Enable Lipopolysaccharide Binding to MD-2, Leading to Toll-Like Receptor-4 Aggregation and Signal Transduction *Journal of Biological Chemistry* **278**,(2003) 48313-48320.
243. Hermanson, G. *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, CA,(1996).
244. Green, N. M. Avidin .1. Use of [¹⁴C]Biotin for Kinetic Studies and for Assay *Biochemical Journal* **89**,(1963) 585.

-
245. Wilchek, M., and Bayer, E. A. Foreword and Introduction to the Book (Strept)Avidin-Biotin System *Biomolecular Engineering* **16**,(1999) 1-4.
246. Rosano, C., Arosio, P., and Bolognesi, M. The X-Ray Three-Dimensional Structure of Avidin *Biomolecular Engineering* **16**,(1999) 5-12.
247. Whittaker, M. M., Ballou, D. P., and Whittaker, J. W. Kinetic Isotope Effects as Probes of the Mechanism of Galactose Oxidase *Biochemistry* **37**,(1998) 8426-8436.
248. Ford, P., Rudd, F. P., Gaunder, R., and Taube, H. Synthesis and Properties of Pentaamminepyridinenethenium (II) and Related Pentaammineruthenium Complexes of Aromatic Nitrogen Heterocycles *Journal of the American Chemical Society* **90**,(1968) 1187-1194.
249. Danilowicz, C., Corton, E., and Battaglini, F. Osmium Complexes Bearing Functional Groups: Building Blocks for Integrated Chemical Systems *Journal of Electroanalytical Chemistry* **445**,(1998) 89-94.
250. Axen, R., Porath, J., and Ernback, S. Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides *Nature* **214**,(1967) 1302.
251. Jakoby, W. B., and Wilchek, M. Methods in Enzymology *Academic Press, London, New York* **34**,(1974) 1-755.
252. Wilchek, M., Miron, T., and Kohn, J. Methods in Enzymology: Affinity chromatography *Academic Press, London, New York* **104**,(1983) 3-55.
253. Kohn, J., and Wilchek, M. A New Approach (Cyano-Transfer) for Cyanogen Bromide Activation of Sepharose at Neutral pH, Which Yields Activated Resins, Free of Interfering Nitrogen Derivatives *Biochemical and Biophysical Research Communications* **107**,(1982) 878-884.
254. Gray, J. S. S., Yang, B. Y., and Montgomery, R. Heterogeneity of Glycans at Each N-glycosylation Site of Horseradish Peroxidase *Carbohydrate Research* **31**,(1998) 61-69.
255. Tams, J. W., and Welinder, K. G. Mild Chemical Deglycosylation of Horseradish-Peroxidase Yields a Fully Active, Homogeneous Enzyme *Analytical Biochemistry* **228**,(1995) 48-55.
256. Eremin, A. N., Shibaev, V. A., Bocharov, V. V., and Metelitsa, D. I. Effect of Surfactants on the Catalytic Activity and Thermostability of Peroxidase in Aqueous Media *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya* **29**,(1993) 534-541.
257. Eremin, A. N., Budnikova, L. P., Sviridov, O. V., and Metelitsa, D. I. Stabilization of Diluted Aqueous Solutions of Horseradish Peroxidase *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya* **38**,(2002) 174-182.
258. Levitskii, V. Y., Melik-Nubarov, N. S., Lepnev, V. I., Shikshnis, V. A., and Mozhaev, V. V. Regulation of Enzyme Thermostability by a Change of Medium Composition Native and Modified Alpha Chymotrypsin *Molekulyarnaya Biologiya (Moscow)* **24**,(1990) 1246-1254.
259. Anawis, M. A., and Lindberg, R. E. Stabilized Horseradish Peroxidase Conjugate Composition Us Patent-4782023,(1988).

260. Taubert, H. Peroxidase Stabilisation in Medium Contg. Proteins or Aminoacids by Addn. of 2,2-Di-Substd. Azine and Opt. Poly:Alcohol GDR Patent 237327,(1986).
261. Taubert, H. Haem Enzymes e.g. Peroxidase Stabilisation in Media Contg. Proteins or Aminoacids by Addn. of Imidazole or Imidazole Derivs GDR Patent 237325,(1986).
262. Montoya, A., and Castell, J. V. Long-Term Storage of Peroxidase-Labeled Immunoglobulins for Use in Enzyme-Immunoassay *Journal of Immunological Methods* **99**,(1987) 13-20.
263. Monsan, P., and Combes, D. Effect of Water Activity on Enzyme Action and Stability *Annals of the New York Academy of Sciences* **434**,(1984) 48-60.
264. Mozhaev, V. V., Sergeeva, M. V., Belova, A. B., and Khmelnsky, Y. L. Multipoint Attachment to a Support Protects Enzyme from Inactivation by Organic-Solvents - Alpha-Chymotrypsin in Aqueous-Solutions of Alcohols and Diols *Biotechnology and Bioengineering* **35**,(1990) 653-659.
265. Chu, C., Liu, B., Watson, D., Szu, S., Bryla, D., Shiloach, J., Schneerson, R., and Robbins, J. B. Preparation, Characterization, and Immunogenicity of Conjugates Composed of the O-Specific Polysaccharide of Shigella Dysenteriae Type 1 (Shiga's Bacillus) Bound to Tetanus Toxoid *Infection and Immunity* **59**,(1991) 4450-4458.
266. Konadu, E., Robbins, J. B., Shiloach, J., Bryla, D. A., and Szu, S. C. Preparation, Characterization, and Immunological Properties in Mice of Escherichia Coli O157 O-Specific Polysaccharide-Protein Conjugate Vaccines *Infection and Immunity* **62**,(1994) 5048-5054.
267. Matsuoka, K., and Moroi, Y. Micelle Formation of Sodium Deoxycholate and Sodium Ursodeoxycholate (Part 1) *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1580**,(2002) 189-199.
268. Lees, A., Nelson, B. L., and Mond, J. J. Activation of Soluble Polysaccharides with 1-Cyano-4-Dimethylaminopyridinium Tetrafluoroborate for Use in Protein-Polysaccharide Conjugate Vaccines and Immunological Reagents *Vaccine* **14**,(1996) 190-198.
269. Shafer, D. E., Toll, B., Schuman, R. F., Nelson, B. L., Mond, J. J., and Lees, A. Activation of Soluble Polysaccharides with 1-Cyano-4-Dimethylaminopyridinium Tetrafluoroborate (CDAP) for Use in Protein-Polysaccharide Conjugate Vaccines and Immunological Reagents. II. Selective Crosslinking of Proteins to CDAP-Activated Polysaccharides *Vaccine* **18**,(2000) 1273-1281.
270. Bystricky, S., Machova, E., Bartek, P., Kolarova, N., and Kogan, G. Conjugation of Yeast Mannans with Protein Employing Cyanopyridinium Agent (CDAP) - An Effective Route of Antifungal Vaccine Preparation *Glycoconjugate Journal* **17**,(2000) 677-680.
271. McIntire, F. C., Sievert, H. W., Barlow, G. H., Finley, R. A., and Lee, A. Y. Chemical Physical and Biological Properties of a Lipopolysaccharide from Escherichia Coli K-235 *Biochemistry* **6**,(1967) 2363.

-
272. Olins, A. L., and Warner, R. C. Physicochemical Studies on a Lipopolysaccharide from Cell Wall of *Azotobacter Vinelandii* *Journal of Biological Chemistry* **242**,(1967) 4994.
273. Abelson, J. N., Simon, M. I., and P., D. M. Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification *Academic Press, London, New York* **182**,(1990) 239-253.
274. Smith, G. C. Surface Analisis by Electron Spectroscopy. Measurament and Interpretation *Plenum Press. New York and London*,(1994).
275. Duarte-Vazquez, M. A., Garcia-Almendarez, B. E., Rojo-Dominguez, A., Whitaker, J. R., Arroyave-Hernandez, C., and Regalado, C. Monosaccharide composition and properties of a deglycosylated turnip peroxidase isozyme *Phytochemistry* **62**,(2003) 5-11.
276. Clamp, J. R., and Hough, L. Periodate Oxidation of Amino Acids with Reference to Studies on Glycoproteins *Biochemical Journal* **94**,(1965) 17-24.
277. Levine, I. N. Fisicoquímica 4ta Edición *McGraw-Hill, Inc. USA* **2**,(1996).
278. Osicka, T. M., and Comper, W. D. Tubular Inhibition Destroys Charge Selectivity for Anionic and Neutral Horseradish Peroxidase *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1381**,(1998) 170-178.
279. Degani, Y., and Heller, A. Direct Electrical Communication between Chemically Modified Enzymes and Metal Electrodes .2. Methods for Bonding Electron Transfer Relays to Glucose Oxidase and D-Amino Acid Oxidase *Journal of the American Chemical Society* **110**,(1988) 2615-2620.
280. Kunugi, S., Murakami, Y., Ikeda, K., and Itoh, N. Chemical Modification of Proteins under High Pressure - Preparation of Ferrocene Attached Bovine Serum Albumin and Glucose Oxidase *International Journal of Biological Macromolecules* **14**,(1992) 210-214.
281. Kandimalla, V. B., Tripathi, V. S., and Ju, H. X. A Conductive Ormosil Encapsulated with Ferrocene Conjugate and Multiwall Carbon Nanotubes for Biosensing Application *Biomaterials* **27**,(2006) 1167-1174.
282. Blonder, R., Levi, S., Tao, G. L., BenDov, I., and Willner, I. Development of Amperometric and Microgravimetric Immunosensors and Reversible Immunosensors Using Antigen and Photoisomerizable Antigen Monolayer Electrodes *Journal of the American Chemical Society* **119**,(1997) 10467-10478.
283. Azzaroni, O., Mir, M., Alvarez, M., Tiefenauer, L., and Knoll, W. Electrochemical Rectification by Redox-Labeled Bioconjugates: Molecular Building Blocks for The Construction of Biodiodes *Langmuir* **24**,(2008) 2878-2883.
284. Ihara, T., Nakayama, M., Murata, M., Nakano, K., and Maeda, M. Gene Sensor Using Ferrocenyl Oligonucleotide *Chemical Communications*,(1997) 1609-1610.
285. Liao, L. B., and Xiao, X. M. Electronic Detection of DNA Utilizing Ferrocenyl Peptide Conjugates Probe *Sensors and Actuators B-Chemical* **115**,(2006) 465-472.
286. Kossek, S., Padeste, C., and Tiefenauer, L. Immobilization of Streptavidin for Immunosensors on Nanostructured Surfaces *Journal of Molecular Recognition* **9**,(1996) 485-487.

287. Wang, J., Ibanez, A., and Chatrathi, M. P. Microchip-Based Amperometric Immunoassays Using Redox Tracers *Electrophoresis* **23**,(2002) 3744–3749.
288. Engvall, E. Methods in Enzymology *Academic Press, London, New York* **70**,(1980) 419–439.
289. Ertl, G., and Kuppers, J. Low Energy Electrons and Surface Chemistry 2nd Edition *VCH Weinheim, Deerfield Beach, FL.*,(1985).
290. Pels, J. R., Kapteijn, F., Moulijn, J. A., Zhu, Q., and Thomas, K. M. Evolution of Nitrogen Functionalities in Carbonaceous Materials During Pyrolysis *Carbon* **33**,(1995) 1641–1653.
291. Xiao, S. J., Textor, M., Spencer, N. D., Wieland, M., Keller, B., and Sigrist, H. Immobilization of the Cell-Adhesive Peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on Titanium Surfaces by Covalent Chemical Attachment *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **8**,(1997) 867–872.
292. Wirde, M., Gelius, U., and Nyholm, L. Self-Assembled Monolayers of Cystamine and Cysteamine on Gold Studied by XPS and Voltammetry *Langmuir* **15**,(1999) 6370–6378.
293. Clark, M. B., Gardella, J. A., Schultz, T. M., Patil, D. G., and Salvati, L. Solid State Analysis of Eumelanin Biopolymers by Electron Spectroscopy for Chemical Analysis *Analytical Chemistry* **62**,(1990) 949–956.
294. Sprik, M., Delamarche, E., Michel, B., Rothlisberger, U., Klein, M. L., Wolf, H., and Ringsdorf, H. Structure of Hydrophilic Self-Assembled Monolayers – A Combined Scanning-Tunneling-Microscopy and Computer-Simulation Study *Langmuir* **10**,(1994) 4116–4130.
295. Chen, J. G., Sandberg, M., and Weber, S. G. Chromatographic Method for the Determination of Conditional Equilibrium Constants for the Carbamate Formation Reaction from Amino Acids and Peptides in Aqueous Solution *Journal of the American Chemical Society* **115**,(1993) 7343–7350.
296. Versteeg, G. F., Van Dijck, L. A. J., and Van Swaaij, W. P. M. On the Kinetics Between CO₂ and Alkanolamines Both in Aqueous and Non-Aqueous Solutions. An Overview *Chemical Engineering Communications* **144**,(1996) 113–158.
297. Bannerman, D. D., Fitzpatrick, M. J., Anderson, D. Y., Bhattacharjee, A. K., Novitsky, T. J., Hasday, J. D., Cross, A. S., and Goldblum, S. E. Endotoxin-Neutralizing Protein Protects against Endotoxin-Induced Endothelial Barrier Dysfunction *Infection and Immunity* **66**,(1998) 1400–1407.
298. Andra, J., Garidel, P., Majerle, A., Jerala, R., Ridge, R., Paus, E., Novitsky, T., Koch, M. H. J., and Brandenburg, K. Biophysical Characterization of the Interaction of Limulus Polyphemus Endotoxin Neutralizing Protein with Lipopolysaccharide *European Journal of Biochemistry* **271**,(2004) 2037–2046.
299. Thieblemont, N., and Wright, S. D. Transport of Bacterial Lipopolysaccharide to the Golgi Apparatus *Journal of Experimental Medicine* **190**,(1999) 523–534.

-
300. Vasselon, T., Hailman, E., Thieringer, R., and Detmers, P. A. Internalization of Monomeric Lipopolysaccharide Occurs After Transfer Out of Cell Surface CD14 *Journal of Experimental Medicine* **190**,(1999) 509–521.
301. Fodor, G., Abidi, S. Y., and Carpenter, T. C. N-Cyanoammonium Salts as Intermediates in the Von Braun Cyanogen Bromide Reaction *Journal of Organic Chemistry* **39**,(1974) 1507–1516.
302. Rudrappa, T., Lakshmanan, V., Kaunain, R., Singara, N. M., and Neelwarne, B. Purification and Characterization of an Intracellular Peroxidase from Genetically Transformed Roots of Red Beet (*Beta Vulgaris* L.) *Food Chemistry* **105**,(2007) 1312–1320.
303. Wolter, A., Niessner, R., and Seidel, M. Preparation and Characterization of Functional Poly(ethylene glycol) Surfaces for the Use of Antibody Microarrays *Analytical Chemistry* **79**,(2007) 4529–4537.
304. Yueh-Hui, L., Sz-Hau, C., Yao-Chen, C., Yi-Chen, L., Shen, T. Y., Chang, C. A., and Chih-Sheng, L. Disposable Amperometric Immunosensing Strips Fabricated by Au Nanoparticles-Modified Screen-Printed Carbon Electrodes for the Detection of Foodborne Pathogen *Escherichia Coli* O157:H7 *Biosensors and Bioelectronics*,(2008) 1832–1837.