



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias

Remoción y detección de endotoxinas desde soluciones proteicas nativa y recombinante: Aplicación de un método de inmunoafinidad.

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular por

Margarita Rodríguez Quezada

Director de Tesis

Dr. Arturo Ferreira Vigouroux.

Co-Directora de Tesis

Dra. María Carmen Molina.

Programa Disciplinario de Inmunología

Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina

Universidad de Chile.

Abril, 2010

Santiago-Chile



INFORME DE APROBACIÓN DE SEMINARIO DE TÍTULO

“Remoción y detección de endotoxinas desde soluciones proteicas nativa y recombinante: Aplicación de un método de inmunoafinidad.”

Seminario de Titulo entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

MARGARITA RODRIGUEZ QUEZADA

Dr. Arturo Ferreira Vigouroux
Director del Seminario

Dra. María Carmen Molina
Co-Directora del Seminario

Comisión de Evaluación

Dra. María Rosa Bono Merino
Presidenta Comisión

Dr. Ricardo Cabrera Paucar
Evaluador

Santiago, Abril de 2010.

*Esta memoria de Vitruvio esta dedicada a mi esposa,
por su amor y paternidad infinitos.
De igual manera esta dedicada a mis padres,
que desde mi infancia comprendieron que mi
mente no tiene limites e hicieron todo lo
posible para que lograra mis metas.*



Soy Margarita Rodríguez Quezada. Nací en la comuna de Pudahuel, el 13 de junio de 1982, primogénita de un matrimonio de origen humilde, comerciantes de ferias libres, quienes se esforzaban cada día para que no me faltara nada.

Desde pequeña tenía inquietud por las ciencias y siempre manifesté mi interés por llegar a la Universidad. Quizás lo que me diferenció de otros niños, con el mismo origen que yo, fue que tuve la suerte de que mis padres me apoyaron y me entregaron las herramientas necesarias para poder surgir, esto sumado a profesores que veían la capacidad en mí. No olvido a mi profesora de primer año de educación básica, la Srta. Jaqueline Quezada, quien incentivó a mi madre para que me diera una buena educación. Fue así como terminé mi enseñanza media en el Liceo Siete de Niñas de Providencia, con el mejor promedio de notas de mi curso. Luego tuve que tomar una difícil decisión, ya que me gustaban mucho dos profesiones, una muy tradicional (Medicina) y otra cuyo nombre nadie recordaba (Ingeniería en Biotecnología Molecular). Elegí la segunda, con la convicción que la terminaría e ingresaría al mundo laboral. A lo largo de la carrera conocí a grandes personas y amigos, también estuvieron los profesores, que me enseñaron algo más que sólo biotecnología.

Pero en el camino me di cuenta que cuando hay dos amores no es fácil elegir, así que decidí que sería ambas cosas...biotecnóloga y médico. Así que mi vida actualmente se reparte entre cursar cuarto año de Medicina, el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana y mi nueva empresa, mi matrimonio, cuyo socio me ha apoyado en todas las decisiones que he tomado y creo que es mi fan número uno.

Finalmente sólo puedo decirles que tengo una vida tranquila y que estoy alcanzando mis metas y espero pronto poner todo el conocimiento que he acumulado a lo largo de estos años a disposición de mi país, ya sea como biotecnóloga y/o como médico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha florecido gracias al inmenso apoyo que he recibido siempre de mis padres, quienes me enseñaron que el trabajo dignifica y que siempre hay que entregar lo mejor de uno. A ellos les agradezco de todo corazón por todo lo que me entregaron y todo su esfuerzo para costear mis estudios.

Especialmente quiero dar las gracias a mi esposo, quien me ha incentivado para que esta Memoria de Título vea la luz. Porque siempre me ha apoyado en cada loca decisión que he tomado.

A mis amigos que compartieron horas de estudio y otras cosas, Rodrigo Caroca, Ricardo Tejos, Sebastián Flores e Ignacio Moreno.

Al Dr. Arturo Ferreira V., Director del Seminario, por lo importante que ha sido su apoyo, que me ha guiado por el camino de la Inmunología, pero también me ha enseñado de la vida, con las múltiples anécdotas que posee.

Agradezco también a la Dra. María Carmen Molina, quien fue de apoyo en momentos difíciles y me guio durante mi trabajo.

A la Dra. Galia Ramírez, Dra. Carolina Ribeiro, Dra. Nandy López, Sra. Juana Orellana, Srta. Ruth Mora, Sra. Gilda Soto y al Sr. Ismael Maldonado, que además de tener el privilegio de trabajar con ellos tengo el placer de considerarnos amigos, gracias por su apoyo y amistad.

A las Sras. Marita Aranguren, Marisol Briones, Oriana Córdova y a las Dras. Mercedes López y Carolina Valck por su apoyo, solidaridad y compañerismo.

A los Sres. Lorena Aguilar, Inelia Butrón, Jaime Venegas, Félix González, Rolando Gallardo, Patricio Farías, gracias por su colaboración, disposición y paciencia.

A FONDECYT (1050133 2005-2008 del Dr. Arturo Ferreira) por su apoyo económico.

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE CONTENIDO.....	i
INDICE DE TABLAS.....	iii
INDICE DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Revisión Bibliográfica.....	3
1.1.1. Estructura y conformación del LPS.....	3
1.1.2. Aspectos inmunológicos y clínicos de la intoxicación con endotoxinas.....	6
1.1.3. Importancia de la Biotecnología en la solución a los problemas de contaminación con LPS.....	9
1.1.4. Métodos de remoción selectiva de endotoxina.....	12
2. HIPÓTESIS.....	15
3. OBJETIVOS.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1. Desarrollar y estandarizar ensayo ELISA para cuantificar LPS.....	16
4.1.1. ELISA directo.....	16
4.1.2. ELISA de competencia.....	16
4.1.3. Precipitación y purificación de Inmunoglobulinas desde suero inmune de conejo.....	17
4.1.3.1. Precipitación de Inmunoglobulinas.....	17
4.1.3.2. Determinación de concentración proteica.....	18
4.1.3.3. Purificación de Inmunoglobulinas.....	18
4.1.3.4. SDS-PAGE.....	18
4.1.3.5. Inmuno Western Blot (IWB).....	19
4.2. Generar una Columna de Inmunoafinidad para Remover LPS.....	20
4.2.1. Montaje de columna.....	20
4.2.2. Protocolo de remoción de LPS.....	20

4.2.3. Análisis de LPS en geles de poliacrilamida-SDS-Tricina.	21
4.2.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS-Tricina.....	21
4.2.3.2. Tinción con plata.	21
4.2.3.3 Inmuno Western Blot para detectar LPS.....	21
4.2.4. Preparación de Calreticulina recombinante de <i>T. cruzi</i>	22
4.2.4.1. Expresión de rTcCRT.	22
4.2.4.2. Purificación de rTcCRT.....	23
4.2.5. Preparación de LPS bacteriano.....	23
4.3. Materiales	24
4.3.1. Soluciones.....	24
4.3.2. Reactivos comerciales.	25
4.3.3. Reactivos LIAM.....	27
5. RESULTADOS	28
5.1. Desarrollo y Estandarización de Ensayo ELISA para Cuantificar	
Lipopolisacáridos.	28
5.1.1. Evaluación de sueros lapinos anti-LPS.	28
5.1.2. Purificación de Inmunoglobulinas totales desde suero policlonal anti-LPS.	30
5.1.3. Construcción de una curva estándar para detección de LPS.	32
5.2. Detección de LPS en Muestras Problemas, usando un Método Alternativo a	
ELISA.	33
5.3. Remoción de LPS	35
5.3.1. Remoción de LPS desde soluciones no proteicas.	35
5.3.2. Remoción de LPS desde soluciones proteicas.....	36
5.3.2.1. Remoción de LPS presente en solución de BSA.	36
5.3.2.2. Remoción de LPS presente en solución de rTcCRT.....	38
5.4. Reconocimiento de LPS de otras bacterias Gram-negativas.	41
6. DISCUSION	43
7. BIBLIOGRAFIA	49

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>Concentraciones habituales de endotoxinas en preparaciones líquidas ordinarias y soluciones proteicas.....</i>	10
Tabla 2: <i>Ejemplos de procesos patentados para remover endotoxinas desde soluciones de proteínas.....</i>	11
Tabla 3: <i>Métodos habituales de remoción de endotoxinas.....</i>	14

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Arquitectura de la pared celular y estructura química general del LPS de bacterias Gram-negativas.....</i>	4
Figura 2. <i>LPS es inmunogénico en conejos.....</i>	28
Figura 3. <i>Titulación de suero lapino anti-LPS.....</i>	29
Figura 4. <i>La reactividad de anticuerpos con LPS en fase sólida es inhibida por el antígeno en fase fluida.....</i>	30
Figura 5. <i>Purificación de inmunoglobulinas G desde suero inmune anti-LPS.....</i>	31
Figura 6. <i>La interacción IgG / LPS en fase sólida es inhibible por el antígeno en fase fluida.....</i>	32
Figura 7. <i>LPS es detectable mediante tinción con plata e IWB.....</i>	33
Figura 8. <i>Curva de calibración de LPS detectado por IWB.....</i>	34
Figura 9. <i>Determinación de la sensibilidad de detección de LPS en IWB.....</i>	35
Figura 10. <i>Detección de LPS removido por columna de inmunoafinidad.....</i>	36
Figura 11. <i>Remoción de LPS, mediante inmunoafinidad, desde una solución proteica....</i>	37
Figura 12. <i>Alta eficiencia de una columna de inmunoafinidad anti-LPS para remover la endotoxina desde una solución proteica.....</i>	38
Figura 13. <i>Remoción de LPS presente en solución de rTcCRT, mediante inmunoafinidad.....</i>	39
Figura 14. <i>Eficiencia de una columna de inmunoafinidad anti-LPS para remover la endotoxina desde una solución proteica.....</i>	41
Figura 15. <i>Anticuerpos lapinos anti-endotoxina reconocen LPS en otras tres especies bacterianas.....</i>	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	: Ácido 2,2' azino bis (3-etil benziltiazonil-6-sulfónico).
Agua d.d.	: agua destilada-desionizada.
BCIP	: Fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil, sustrato de fosfatasa alcalina.
BSA	: Sero albúmina bovina.
CD	: Marcador celular de diferenciación.
CRT	: Calreticulina
CSF	: Factor estimulante de colonias
DNA	: Ácido desoxirribonucleico.
EDTA	: Ácido etilendiamino-tetra-acético.
ELISA	: Ensayos inmuno enzimáticos.
EU	: Unidad Endotóxica.
GFP	: Proteína fluorescente verde.
Ig	: Inmunoglobulina.
IL	: Interleukina
IWB	: Immuno western blot.
LAL	: Ensayo de Lisado de <i>Limulus</i> .
LIAM	: Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana
LPS	: Lipopolisacárido.
MHC	: Complejo principal de histocompatibilidad.
NBT	: Nitro-azul tetrazolio; cloruro de 2,2'-di-p-nitrofenil-5,5'-difeníl-[3,3'-dimetoxi -4,4'-difeníl] ditetrazolio
NO	: Oxido nítrico.
PSA	: Persulfato de amonio
PBS	: Buffer fosfato salino.
PBS-BSA	: Sero albúmina bovina al 1% en PBS.
PBS-Soya	: Proteínas de soya 0,5% p/v en PBS-T.
PBS-T	: PBS conteniendo 0.05 % v/v Tween 20.
rTcCRT	: Calreticulina recombinante de <i>T. cruzi</i> .
SDS-PAGE	: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio.
TCR	: Receptor de células T.
TEMED	: N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
Th	: Linfocitos T helper.

TLR-4 : Receptor tipo Toll 4
TNF α : Factor de necrosis tumoral α .
UCI : Unidad de Cuidados Intensivos.

RESUMEN

Los lipopolisacáridos (LPS) o endotoxinas bacterianas, son contaminantes de muchas proteínas purificadas, en particular recombinantes derivadas de *E. coli*. El LPS es altamente pirogénico, ya que induce la liberación de $TNF\alpha$ por parte de una variedad de células, principalmente macrófagos. Para remover LPS de las preparaciones biológicas se han desarrollado técnicas tales como ultrafiltración, extracción en dos fases, cromatografía de intercambio aniónico, etc., con efectividad limitada.

Hemos generado sueros de conejos (lapinos) anti-LPS, para montar una columna de extracción por inmunoafinidad, junto con un método de detección y cuantificación de LPS en muestras problemas por ELISA y por IWB. Las inmunoglobulinas G lapinas fueron precipitadas y purificadas desde los sueros policlonales y mediante ELISA de competencia fue posible la detección de LPS, con una sensibilidad de 31,3 ng/ml, similar a la obtenida mediante IWB, aunque con un menor costo en ésta.

Con las inmunoglobulinas purificadas se montó una columna cromatográfica en Sefarosa activada con bromuro de cianógeno. En esta columna se ensayó la capacidad de remoción de LPS presente en distintas soluciones de concentración conocida de endotoxina y en preparaciones de proteínas recombinantes. La eficiencia de extracción de LPS fluctuó entre total y parcial, dependiendo de la presencia de proteínas. Las pérdidas de proteínas acompañantes variaron entre 10% y 45%, dependiendo de las características de éstas.

En síntesis, a pesar que la metodología propuesta difícilmente extraerá totalmente el LPS que pudiera contaminar distintas preparaciones biológicas, ofrece una alternativa válida para disminuir significativamente la contaminación, a niveles compatibles con una variedad de ensayos *in vitro* y, presumiblemente, *in vivo*.

Abstract

Lypopolysaccharides (LPS) are bacterial endotoxins that are frequently present in purified proteins, particularly recombinant proteins derived from *Escherichia coli*. LPS is highly pyrogenic, since it induces tumor necrosis factor (TNF) secretion by many cell types, especially macrophages. Several techniques have been developed to remove LPS from biological preparations, such as ultrafiltration, two-phase extraction, and ion-exchange chromatography, all of them with limited efficiency.

We obtained anti-LPS sera from rabbits to generate an immunoaffinity extraction column as well as a method to detect and quantify LPS in protein samples by ELISA and immunowesternblot (IWB). Polyclonal immunoglobulins (Ig) G were precipitated and purified from rabbit sera. LPS was detected by competitive ELISA, which presented high sensitivity (31,3 ng/ml), similar to that obtained by IWB, which is less costly.

The purified IgGs were then used to generate a chromatographic column at Sepharose-activated with cyanogen bromide. The column was tested for its capacity to remove LPS from a variety of solutions whose endotoxin concentration was previously known, as well as from recombinant protein preparations. The efficiency of LPS extraction fluctuated between total and partial, depending on the presence of proteins. The losses of associated proteins varied between 10% and 45%, according to their characteristics.

In synthesis, even though the proposed methodology would hardly remove completely the LPS that contaminates distinct biological preparations, it offers a valid alternative to reduce contamination to such an extent that is compatible with a wide range of *in vitro* assays, and, presumably, also in *in vivo* approaches.

1. INTRODUCCION

En el siglo XIX Richard Pfeiffer (1858-1910), un colaborador de Robert Koch en el Instituto para las Enfermedades Infecciosas en Berlín (Alemania), descubrió que lisados de bacterias *Vibrio cholerae*, muertas por calor, provocaban una reacción de shock tóxico en cuyes. Él postuló, además, que la toxina termoestable era intrabacteriana, por lo que fue llamada endotoxina, para distinguirlas de las ya conocidas exotoxinas del *Vibrio cholerae* (Pfeiffer, 1892; Rietschel & Westphal, 1999). Aproximadamente al mismo tiempo, William B. Coley (1862-1936), trabajando en el "Memorial Hospital" en Nueva York, trató pacientes que sufrían de sarcomas en etapas avanzadas con inyecciones de mezclas de bacterias Gram-positivas y negativas muertas por calor ("toxinas de Coley"). Esta terapia, que duró cerca de tres décadas, frecuentemente causaba remisión de los tumores sin que hubiese recaídas en por lo menos 5 años. Pero los pacientes al ser tratados con esta terapia mostraban dramáticos efectos secundarios, como fiebre elevada y reacción de shock tóxico (Coley, 1894; Coley-Nauts y col, 1946; Starnes, 1992 y Wiemann & Starnes, 1994).

Hoy sabemos que los efectos biológicos mostrados por las preparaciones bacterianas que usó Coley, se deben principalmente a la presencia de una sustancia denominada Lipopolisacárido (LPS). El LPS es una molécula extremadamente termoestable, resistente al pH y anfífilica, que está compuesta de dos regiones principales, una porción lipídica y una porción de poli-oligosacaridos (Holst y col, 1996). Es un componente integral de la membrana externa de la gran mayoría de las bacterias Gram-Negativas, las que están frecuentemente asociadas a humanos, ya sea como comensales o como patógenos (Alexander & Rietschel, 2001).

Las endotoxinas bacterianas, como el LPS, muestran fuertes efectos biológicos a muy bajas concentraciones, cuando entran al flujo sanguíneo de humanos y muchos animales, por ejemplo, durante una infección o por aplicación intravenosa de un medicamento. Por esto es necesario removerlo de soluciones de aplicación parenteral. El nivel umbral para aplicación intravenosa es 5 Unidades de Endotoxina ("Endotoxin Units", EU) por kg por hora, de acuerdo con las farmacopeas disponibles. El término EU describe la actividad biológica de una endotoxina. Por ejemplo, 100pg de la endotoxina estándar EC-5, 200pg de EC-2 y 120pg de la endotoxina de *Escherichia coli* O111:B4 tienen una actividad de 1 EU. Sin embargo, se acepta como regla promedio que 1 EU corresponde a 100pg de endotoxina. Lograr disminuir LPS por debajo de este nivel umbral siempre ha sido un desafío en investigación y en la industria farmacéutica (Petsch & Anspach, 2000).

La remoción de trazas indeseables de endotoxinas, hasta el nivel umbral, se ha transformado en un problema, principalmente para los avances biotecnológicos, dado el masivo uso de *Escherichia coli* como vector para una gran variedad de proteínas recombinantes. Por ello, se han planteado muchas formas de remoción, como técnicas de ultrafiltración, extracción en dos fases, cromatografía de intercambio aniónico, etc. (Petsch & Anspach, 2000), ninguna de las cuales ha tenido una buena efectividad, debido principalmente a la heterogeneidad física y química de las endotoxinas. Esto hace complicado desarrollar un método de aplicación general para la remoción de LPS desde soluciones proteicas.

Un método muy eficiente es la remoción de endotoxina con polimixina B, no aplicable a preparaciones de uso animal o humano, debido a la neuro y nefrotoxicidad del antibiótico (Newton, 1956), además de estimular monocitos que liberan interleukina-1 (IL-1) (Damais y col, 1987). Una alternativa a la remoción de endotoxina con

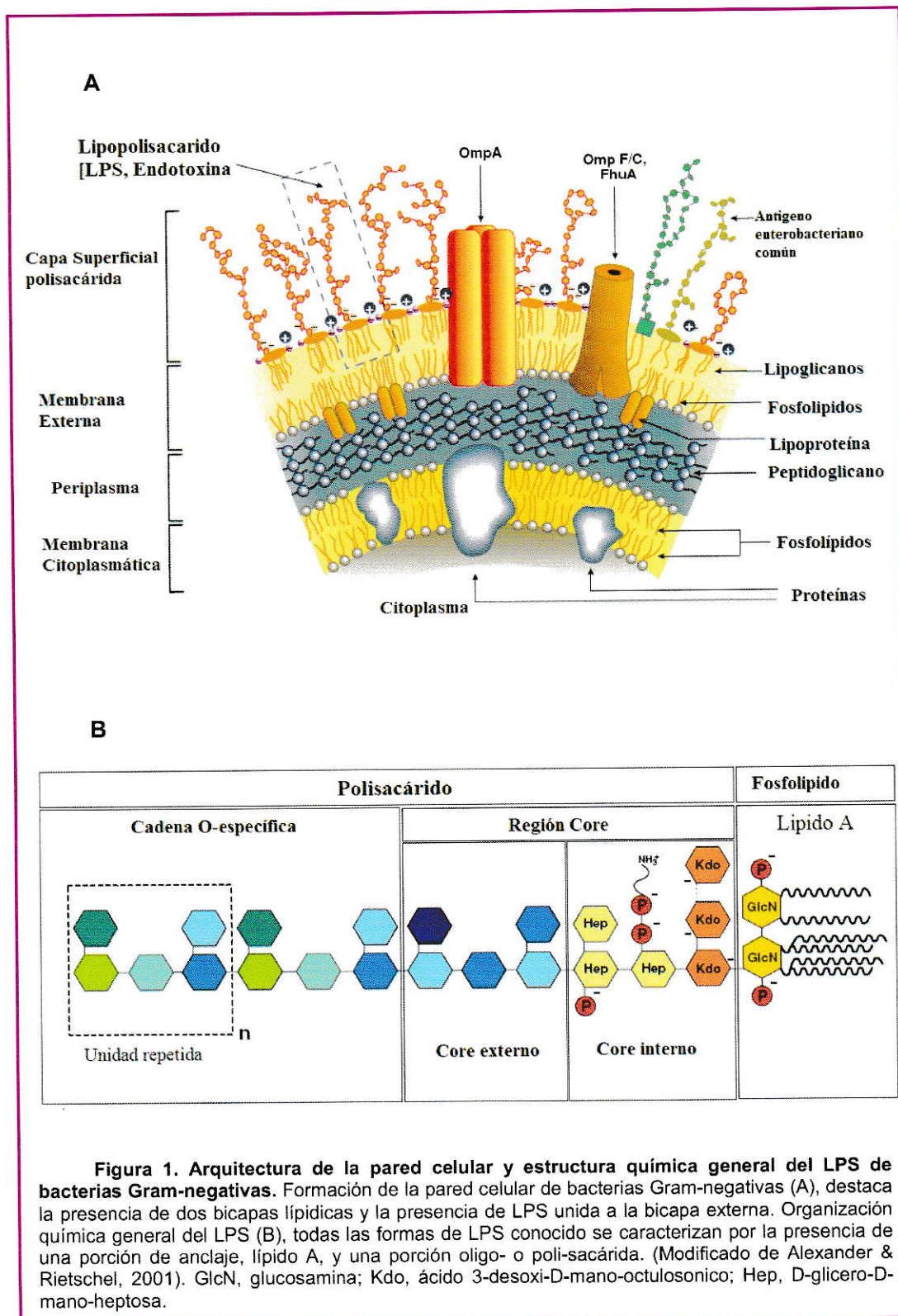
productos químicos es la remoción por cromatografía de inmunoafinidad (Goldbaum y col, 1994), pero este tipo de tecnologías no han sido muy difundidas, debido a que muchos de estos procedimientos son motivo de patentes por las grandes empresas farmacéuticas. Además, la generación de inmunidad humoral experimental contra LPS tiene complicaciones, que serán detalladas más adelante.

1.1. Revisión Bibliográfica.

1.1.1. Estructura y conformación del LPS

Las endotoxinas son parte integral de la membrana celular externa de bacterias Gram-negativas, responsables de su organización y estabilidad. Una sola *Escherichia coli* puede tener cerca de $3,5 \times 10^6$ moléculas de LPS (Roberts, 1996), cubriendo aproximadamente las tres cuartas partes de la superficie bacteriana (**Figura 1, A**). Como estructura dominante de la superficie, también participa en la interacción de la bacteria con su ambiente y posibles huéspedes (Vaara & Nikaido, 1984). Aunque el LPS está firmemente anclado a la membrana externa, es constantemente liberado durante la muerte celular, y durante el crecimiento y división celular, lo que hace que grandes concentraciones de LPS compliquen diversos procedimientos científicos o bioprocesos (Petsch & Anspach, 2000).

La estructura del LPS varía entre distintas especies de bacterias, incluso es posible encontrar diferencias entre distintas cepas de una especie. Sin embargo, la estructura general del LPS resulta comparable para todas ellas. Ésta consiste en dos zonas con composición química claramente definidas; la primera fosfolipídica o lípido A, está fuertemente anclada a la membrana externa. La otra, está constituida por polisacáridos, covalentemente unidos a la región lipídica (**Figura 1, B**).



La gran diversidad del LPS observada en bacterias de especies distintas, se debe a variaciones en ambas zonas (polisacárida y lipídica), en cambio la diversidad observada dentro de cepas de una misma especie, se debe a variaciones en la composición macromolecular de la porción polisacárida (Holst y col, 1996; Rietschel y col, 1996).

Desde el trabajo de Otto Westphal (Westphal y col, 1952) se han publicado numerosos estudios sobre la composición química de tres regiones del LPS. Como se indicó anteriormente, el LPS tiene una estructura característica, construida en bloques con dos zonas, una lipídica y otra sacárida, ésta se subdivide en dos regiones, cadena O-específica y Core, más próxima al Lípido A. Además, las tres regiones tienen características biológicas, químicas, genéticas y serológicas diferentes (Petsch & Anspach, 2000).

La cadena O-específica (Antígeno O) (**Figura 1, B**), consta de más de 50 unidades de oligosacáridos repetidos, formados por bloques de 2-8 monosacáridos ordenados de manera altamente específica para cada especie y cepa (Alexander & Rietschel, 2001). La pérdida de esta zona se ha asociado con una mayor patogenicidad (Yamasaki y col, 1994; Risberg y col, 1999).

De acuerdo a los monosacáridos predominantes la región Core se puede dividir en un Core externo y otro interno, próximo al Lípido A (**Figura 1, B**). El Core externo consiste principalmente de hexosas, tales como D-glucosa, D-galactosa, D-glucosamina, N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina. El Core interno es menos variado, pero posee monosacáridos específicos, como el ácido 3-desoxi-D-mano-octulosónico (Kdo) y el L- o D-glicero-D-mano-heptosa (L, D-Hep) (Holst y col, 1996).

La región del Lípido A (**Figura 1, B**) representa el principio inmunoestimulador o principio endotóxico del LPS, según planteó Westphal y Lüderitz en 1954, hipótesis

fundada en el hecho que mutantes con LPS compuesto sólo por Kdo y Lípido A son activos endotóxicamente. Investigaciones biomédicas han señalado que la toxicidad del LPS se debe principalmente al Lípido A. Además, es en esta zona donde radica mayormente la pirogenicidad de la endotoxina, si la comparamos con la molécula completa (Westphal & Lüderitz, 1954; Galanos y col, 1985). Esta región consiste de un disacárido β -1,6 de glucosamina, unido mediante enlaces amida y éster al grupo hidróxilo de moléculas de 12-16 átomos de carbono. Esta zona hidrofóbica se arregla hexagonalmente, lo que resulta en una estructura más rígida que el resto de la molécula. No se conoce cepas bacterianas Gram- negativas sin Lípido A. La región Core más cercana al Lípido A y el mismo Lípido A son fosforilados parcialmente, por lo que exhiben cargas negativas en soluciones proteicas comunes. El peso molecular de un monómero de endotoxina es alrededor de 10 kDa, aunque también es posible encontrar de 15-20 kDa debido a la variabilidad de la cadena oligosacárida (Petsch & Anspach, 2000).

1.1.2. Aspectos inmunológicos y clínicos de la intoxicación con endotoxinas.

Los mecanismos de acción de la endotoxina o el Lípido A afecta indirectamente a la célula, al mediar respuestas inmunológicas que son las responsables de los peligrosos efectos adversos observados. En mamíferos, el blanco primario del LPS son las células fagocíticas del sistema inmune innato, monocitos periféricos, células dendríticas, macrófagos tisulares y neutrófilos, los que constitutivamente expresan el "Toll-like receptor 4" (TLR4), molécula de reconocimiento de patógenos, que se une a MD-2 y a CD14 (Banchereau & Steinman, 1998; Haziot y col, 1988; Kitchens, 2000, Muzio y col, 2000; Shimazu y col, 1999). El valor umbral para la activación de monocitos por LPS, presente en suero de cultivo celular, es de 1-10 pg/ml (Alexander

& Rietschel, 2001). Y la activación, *in vitro*, de estas células con LPS o Lípido A, produce la liberación de un amplio espectro de mediadores endógenos, la mayoría de los cuales son citoquinas pro-inflamatorias, tales como TNF- α , factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF), interleukinas (IL)1, 6, 8, 12, 15 y 18, los factores estimulantes de colonias M-CSF, G-CSF, y GM-CSF, prostaglandina E₂ (PGE₂), tromboxano A₂ (TXA₂), también especies reactivas del oxígeno, como anión superóxido (O₂⁻), radicales hidroxilo ([•]OH) y óxido nítrico (NO). La estimulación del sistema inmune, por parte del LPS, produce la activación de la triada clásica proinflamatoria, TNF- α , IL-1 e IL-6, las que pueden iniciar reacciones secundarias. Entre éstas está estimular a los hepatocitos a producir proteínas de fase aguda, la activación de linfocitos, mastocitos, eosinófilos, trombocitos y basófilos, entre otras. Además, IL-1 e IL-6 son los mediadores primarios en la inducción de fiebre (Blatteis & Sehic, 1998; Dinarello, 1999; Eskay y col, 1990; Suffredini y col, 1999; Wada y col, 1995; Zeisberger & Roth, 1993).

Aparte del reconocimiento celular por parte de los fagocitos, distintos tipos de LPS o Lípido A inducen una intensa y rápida activación específica de las Rutas Clásica, Alterna y de las lectinas del Sistema del Complemento (Galanos y col, 1971; Freudenberg & Galanos, 1978; Cooper & Morrison, 1978; Vukajlovich, 1986; Mold y col, 1999).

En mamíferos, la activación del sistema inmune innato, vía el reconocimiento del Lípido A por TLR-4, induce la activación del Sistema Inmune Adaptativo, a través de la maduración y expansión clonal de Linfocitos T y Linfocitos B, creándose de este modo una respuesta humoral contra todos los antígenos presentes en las bacterias, incluidos el LPS. Esta respuesta humoral puede medirse por dos vías alternativas, no

exclusivas. La primera se debe a la presentación del LPS como un hapteno. Sólo macromoléculas, casi exclusivamente proteínas, son inmunogénicas, es decir, activan linfocitos B. Por lo tanto, moléculas como LPS son incapaces por si solas de montar una respuesta inmune, aunque haya linfocitos B con receptores inmunoglobulínicos específicos para ellas. Una molécula proteica transportadora, procesada por linfocitos B con receptores para LPS, será presentada a linfocitos Th. Éstos secretarán citoquinas que, paracrinamente, proporcionarán segundas señales necesarias para la activación B y la secreción de las inmunoglobulinas anti LPS. Esta presentación sería del tipo convencional mediado por MHC (Abbas A y col. 2000). La segunda vía está mediada por el "Cluster" de Diferenciación 1 (CD1), molécula similar a MHC de clase I, que permite el reconocimiento de antígenos lipídicos por parte del Receptor de Células T (TCR) restringidos a CD1, que modulan la activación de Linfocitos B, los que producen anticuerpos anti-Lípido A (Brigl & Brener, 2004). La activación de la Inmunidad Innata y Adaptativa, inducida por el Lípido A, genera memoria inmunológica protectora contra la especie y cepa de bacteria Gram-negativa que infectó (Rietschel y col, 1996; Holst y col, 1996; Medzhitov & Janeway, 2000).

La principal complicación en la Unidad de Cuidados Intermedios (UCI) corresponde a una sepsis severa o a un shock séptico, principalmente en pacientes politraumatizados, quemados, en recuperación de cirugía o transplantados recibiendo altas dosis de inmunosupresores. En distintos estudios realizados durante la década pasada se encontró un nivel plasmático de endotoxina elevado en cerca del 70-80% de los pacientes con sepsis severa y shock séptico (Casey y col, 1993; Danner y col, 1991; Opal y col, 1999). La sepsis se caracteriza por una desbalanceada liberación de factores pro- y anti-inflamatorias, inducidos por endotoxinas, y sus manifestaciones clínicas incluyen fiebre, coagulación sanguínea intravascular diseminada o hipotensión

aguda seguida de disfunción o falla multiorgánica (Bellingan, 1999; Rietschel y col, 1996; Suffredini & O'Grady, 1999; Woltmann y col, 1998). En algunos de estos pacientes se han detectado niveles plasmáticos de LPS superiores a 300 pg/ml (Opal y col, 1999), se ha demostrado una significativa correlación entre los niveles plasmáticos de LPS y la mortalidad en pacientes con infecciones con meningococo (Brandtzaeg y col, 1989).

En casos de sepsis con una elevada endotoxemia, se ha probado la combinación de antibióticos, con la administración de agentes que neutralicen la acción de las endotoxinas. En la década pasada distintas estrategias fueron probadas como aplicación de anticuerpos específicos que neutralicen el LPS, proteínas recombinantes de reconocimiento de LPS y técnicas de hemofiltración extracorporal (Opal & Yu, 1998; Wyckoff y col, 1998).

1.1.3. Importancia de la Biotecnología en la solución a los problemas de contaminación con LPS.

Si vemos la **Tabla 1** (modificada de Petsch & Anspach, 2000), los seres humanos estamos constantemente expuestos a las endotoxinas, por contacto con la piel y el tracto digestivo, frecuentemente sin consecuencias patológicas. Distinto es cuando estas sustancias están presentes sistémicamente, como ya vimos en el ítem anterior. Es por este motivo que se debe cuidar el proceso de producción de un producto de aplicación parenteral, para disminuir hasta los límites aceptables o eliminar por completo las endotoxinas que pueden estar presentes. Además muchas proteínas recombinantes o nativas purificadas, con uso farmacológico, son aplicadas en bajas dosis, pero incluso trazas de endotoxinas pueden ser causa de rechazo de un determinado producto, al no cumplir con los estándares exigidos para él. Por ejemplo,

mientras que para la insulina se permiten 10EU/mg, para el α -interferon se aceptan hasta 100EU/mg, de acuerdo a la Farmacopea Europea (1997). En cambio la seroalbumina o los anticuerpos monoclonales son administrados en varios cientos o miles de miligramos por kg de peso corporal, y es en estos casos donde los niveles de endotoxinas dejan de ser un asunto trivial (Petsch & Anspach, 2000). Por lo anterior, se hace necesario contar con métodos de remoción de trazas de endotoxinas, que aseguren niveles aceptables en las preparaciones de proteínas purificadas.

La biotecnología ofrece variados métodos para producir proteínas. Entre éstos encontramos bioprocesos microbianos, para producir proteínas humanas tales como hormonas del crecimiento e interferones. También existen técnicas de cultivo con células animales, levaduras y hongos para producir, por ejemplo, anticuerpos monoclonales.

Tabla 1

Concentraciones habituales de endotoxinas en preparaciones líquidas ordinarias y soluciones proteicas.

Fuente	solución	Conc. (EU/ml)
Agua mineral		1-20
Agua de piscina		25.600
Proteínas desde cultivos de <i>E. coli</i> de alta densidad	Sobrenadante después de homogenización	>2.000.000
IgG ₁ murina desde cultivo celular	Filtrado del cultivo	≤100
Suero procesado de leche de supermercado	Sobrenadante después de la precipitación ácida de la leche	≈10.000
Preparación comercial de BSA	1mg/ml de proteína liofilizada	0,5-50

Modificado de Petsch & Anspach, 2000.

En la producción de proteínas recombinantes las endotoxinas son un tema importante, la concentración de LPS en estos productos depende del bioproceso involucrado y de la fuente del producto, y va desde menos que 100 EU/ml en

sobrenadantes de cultivos celulares hasta más de 1.000.000 EU/ml en sobrenadantes de cultivos bacterianos de alta densidad.

La presencia de diversas concentraciones de LPS en preparaciones de proteínas recombinantes, usadas en investigación biomédica, puede tener consecuencias desde irrelevantes a insospechadas. Su remoción hasta niveles aceptables es esencial en muchos casos. Es predecible que la eficiencia de remoción será variable de acuerdo a las características de la proteína recombinante. Así, en proteínas que posean dominios afines por LPS, la eficiencia del procedimiento podría ser menor.

Se han desarrollado muchas técnicas para remover LPS presente en muestras de interés (**Tabla 2**), pero éstas están más relacionadas con la proteína a purificar que con características propias del LPS. Por consecuencia, su uso no es aplicable a distintas proteínas, sin mencionar el hecho que estos procedimientos han sido patentados y su uso queda restringido. Es necesario destacar que muchas veces el LPS queda adsorbido a las proteínas (Petsch & Anspach, 2000) por fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Esto deriva en pérdidas importantes de proteínas o un enmascaramiento del LPS en la misma.

Tabla 2

Ejemplos de procesos patentados para remover endotoxinas desde soluciones de proteínas.

Producto	Procedimiento
Superóxido dismutasa	Ultrafiltración
Mioglobina	
Cu-Zn-superoxido dismutasa	Cromatografía de intercambio anionico
Urokinasa	
TNF, IL-1	Adsorción quitosan cuaternario
Antígeno de superficie de hepatitis B	Cromatografía de interacción hidrofóbica
Vacuna de <i>Pertussis</i>	Centrifugación en gradiente de sucrosa
Inmunoglobulinas	Extracción con sales biliares
Lipocortina	Extracción con detergentes
Inmunoglobulinas	Digestión con pepsina remueve endotoxina unida al fragmento Fc.

Modificado de Petsh & Anspach, 2000.

En los estados finales de una purificación es posible encontrar a la proteína en un rango de concentración de g/l y a las endotoxinas en mg/l. No hay técnicas que permitan la detección directa de LPS en picogramos por ml. Aún hoy conocemos casos- no publicados- en que una nueva sustancia farmacéutica resultó ser pirogénica, y que posteriormente se determinó que su pirogenecidad no radicaba en la sustancia misma, sino en las endotoxinas que contenía (Petsch & Anspach, 2000). Varios bioensayos están disponibles para medir endotoxinas, tal como el “test del conejo” el “ensayo del lisado del amebocito *Limulus*” (LAL) (Pearson, 1985) y el “ensayo de letalidad del embrión de pollo” (Galanos y col, 1971). De estos, el ensayo LAL es el más sensible, con menores implicancias éticas y el más económico, pero aún así para la realidad chilena sigue siendo de elevado costo.

El sistema LAL se basa en la reacción que induce el LPS al contactar con proteínas sanguíneas de *Limulus polyphemus* (o especies relacionadas de amebocitos como *Tachypleus tridentatus*, *T. gigas* o *T. rotundicauda*), activando la coagulación del sistema e iniciando la formación de un gel. Se puede obtener una sensibilidad de 0.02 EU/ml, pero se ha observado que hay muchas sustancias que interfieren con la cascada de coagulación, causando falsos positivos o negativos. Por esto junto con la necesidad de encontrar un método de remoción efectiva de LPS, se hace urgente desarrollar un método que permita determinar endotoxinas en bajas dosis.

1.1.4. Métodos de remoción selectiva de endotoxina.

Durante la purificación de una proteína recombinante quedan trazas de endotoxinas, esto independiente de los métodos de clonación y purificación. Muchos investigadores se han enfrentado a esta misma situación y han desarrollado métodos de remoción del LPS, pero ninguno ha mostrado la eficiencia requerida, teniendo como

meta la menor pérdida de proteína blanco. En la **Tabla 3** se muestra un resumen de las técnicas más usadas para remover LPS, ya sea desde soluciones libres de proteínas, como puede ser el agua ultrapura o soluciones de antibióticos de aplicación endovenosa hasta soluciones con macromoléculas, como DNA y proteínas. Cada método tiene desventajas (**Tabla 3**), lo que permitirá hacer una comparación con el método de cromatografía de inmunoafinidad propuesto en esta Memoria de Título.

Tabla 3
Métodos habituales de remoción de endotoxinas.

Método	Adsorbente	Sustrato	Desventaja	Referencia
Ultrafiltración	Membrana de poro 10kDa	Agua y soluciones con moléculas de tamaño pequeño.	No se puede usar en soluciones proteicas.	Morrison & Leive, 1975
Extracción en dos fases	Detergente como Triton X-114	Soluciones proteicas	Costoso y es un proceso en varios pasos	Karplus y col, 1987, Liu y col, 1997.
		citocromo c, catalasa y albumina.	Varios pasos con una pérdida de 2% de proteína por paso.	Aida y Pabst, 1990
		GFP	Proteína fusionada a surfactante, específico.	Mazzola y col, 2006
Cromatografía de intercambio aniónico	DEAE o grupos amino cuaternarios	Soluciones libres de proteínas o soluciones de proteínas básicas.	No se puede usar en proteínas acidas y pueden verse afectadas por las variaciones de pH.	Neidhardt y col, 1992.
		Uroquinasa	Método patentado	Green-Cross, 1986.
Adsorción por afinidad	Polimixina B	Soluciones proteicas y soluciones de DNA.	Neuro- y nefrotoxicidad de polimixina B y estimulación de monocitos a liberar IL-1. Además hay una pérdida de alrededor del 20% de la proteína.	Karplus y col, 1987, Anspach & Hilbeck, 1995.
		Solución de CRT porcina nativa.	No se hace referencia al porcentaje de pérdida de proteína.	Reed y col, 2003.
		Histamina e histidina	Se realiza a pH<5	Legallais y col, 1997.
	Ligandos policatiónicos (poli-etileneimina (PEI), poli-L-lisina (PLL), poli-L-histidina (PLH))	Soluciones proteicas	Sensibilidad de los adsorbentes al pH, los adsorbentes pueden tener elevado precio y deben estar acordes con las características de las proteínas.	Mitzner y col, 1993, Hirayama y col, 1999,
Cromatografía de inmunoafinidad	Anticuerpo anti-LPS	Amplio espectro	Poca información al respecto por motivos de patente. Dificultad de generar inmunidad contra LPS	Goldbaum y col, 1994.

Basada en los antecedentes anteriores propongo la siguiente hipótesis

2. HIPÓTESIS

Anticuerpos lapinos policlonales monoespecíficos anti-LPS unidos a una matriz sólida removerán LPS desde soluciones proteicas

3. OBJETIVOS

General:

Desarrollar método inmunocromatográfico que permita remover endotoxinas contaminantes de preparaciones biológicas, que sea altamente eficiente y de amplio espectro.

Específicos:

1. Desarrollar y estandarizar ensayo ELISA para cuantificar lipopolisacáridos.
2. Generar una columna de inmunoafinidad para remover lipopolisacáridos.
3. Ensayar la columna estandarizada en su capacidad para remover LPS desde soluciones de una proteína recombinante y una nativa.
4. Determinar la capacidad de los anticuerpos para reconocer LPS de otras especies bacterianas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Desarrollar y estandarizar ensayo ELISA para cuantificar LPS.

4.1.1. ELISA directo

Método de Engval y Perlman (Engval y Perlman, 1971). Placas de microtitulación de policarbonato (Nunc, USA) fueron sensibilizadas con 1, 0,5 y 0,1 μg de LPS (Sigma-Aldrich, USA), diluido en Buffer Carbonato (sección 4.3.1), e incubadas toda la noche a 4°C. Luego de lavar cuatro veces con PBS-Tween 20 (Sigma,USA) (0,05% v/v) (PBS-T), se bloqueó cada pocillo con 200 μl de PBS-T-Proteína de Soya 0,5% p/v (PBS-T-Soya) o con PBS-T-BSA 1% p/v (PBS-T-BSA). Se incubó con soluciones seriadas del suero anti-LPS diluido en PBS-T-Soya o PBS-T-BSA, en triplicado, durante 2 horas a 37°C. Nuevamente, se lavaron las placas y se incubaron con 100 μl /pocillo de IgG de cabra diluida 1:1.500, conjugada a peroxidasa, anti-inmunoglobulinas de conejo (DAKO, Dinamarca), en PBS-Soya, durante 90 min. a 37°C. Finalmente, y tras lavar las placas, se agregó en cada pocillo 100 μl de solución sustrato para peroxidasa, ácido 2,2' azino bis 3-etil benziltiazonil-6-sulfónico (ABTS) (Sigma-Aldrich, USA)/H₂O₂ (sección 4.3.1), se dejó en agitación orbital a 200 rpm y se determinó la absorbancia a 405 nm (Microplate reader, Bio-Rad), a los 5, 10, 15 y 25 min. Como control positivo de la inmunosonda se sensibilizó un pocillo con suero normal de conejo.

4.1.2. ELISA de competencia.

Placas de microtitulación de policarbonato (Nunc, USA) fueron sensibilizadas con 100 μl /pocillo de LPS (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), diluido en Buffer Carbonato (sección 4.3.1), e incubadas toda la noche a 4°C. Luego de lavar cuatro veces con PBS-T, se bloqueó

cada pocillo con 200 μ l de PBS-T-Soya o PBS-T-BSA. Se incubó 90 min. a 37°C (Dynamic Incubator, ABBOTT). Luego de lavar, la placa fue incubada con 100 μ l/pocillo del suero inmune diluido 1/3.000 o con 100 μ l de IgG purificadas, desde suero inmune, en dilución 1/1.500, por 1h a 37°C. Los anticuerpos fueron preincubados durante 2 h a 37°C, con distintas cantidades de LPS (8.000, 2.000, 500, 125, 30 y 0 ng totales). En seguida, se incubó con 100 μ l/pocillo de IgG de cabra diluida 1:1.500, conjugada a peroxidasa, anti-inmunoglobulinas de conejo (DAKO, Dinamarca), durante 90 min. a 37°C. Finalmente, y tras lavar la placa, se agregó en cada pocillo 100 μ l de solución sustrato para peroxidasa, ABTS (Sigma-Aldrich, USA)/ H₂O₂ (sección 4.3.1), se dejó en agitación orbital a 200 rpm y se leyó la absorbancia a 405 nm (Microplate reader, Bio-Rad), a los 5, 10, 15 y 25 min. Como control negativo y positivo de la inmunosonda se sensibilizó un pocillo con PBS-BSA y otro con suero normal de conejo, respectivamente.

4.1.3. Precipitación y purificación de Inmunoglobulinas desde suero inmune de conejo.

4.1.3.1. Precipitación de Inmunoglobulinas. Se colocó en vaso precipitado 5 ml de suero de conejo anti-LPS y 5ml de PBS a 4°C en agitador magnético. Se agregó muy lentamente 10ml de Sulfato de Amonio saturado, agitándose constantemente. Se dejó toda la noche a 4°C. Posteriormente se centrifugó (Centra MP4R, IEC) a 3500 g por 30 min., y se recuperó el pellet. Éste se lavó en solución de Sulfato de Amonio al 50% (v/v) en PBS y se centrifugó a 25000 g por 10 min. El pellet fue resuspendido en 2,5ml de PBS, para ser dializado contra PBS-Azida 0,002%. Finalmente, se

descomplementó la solución, a 56°C durante 30 min., se centrifugó a 25000 g por 15 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante.

4.1.3.2. Determinación de concentración proteica. (Bradford, 1976) La concentración de proteínas se realizó mediante el método de Bradford, modificado por Spector (1978). Brevemente, a 1 ml de Reactivo de Bradford (Bio-Rad, USA) se agregó 20 µl de muestra. Se mezcló suavemente, se dejó reposar por 5 min. y se leyó la absorbancia a 595nm. Los valores de concentración se interpolaron desde una curva de calibración realizada con BSA (US Biological, USA) de 0,2 a 0,8 mg/ml.

4.1.3.3. Purificación de Inmunoglobulinas. (Björck & Kronvall, 1987). La purificación de IgG desde suero se realizó mediante cromatografía de afinidad en una columna de Sefarosa-Proteína G (GE Healthcare, Suecia). La muestra, sometida al procedimiento cromatográfico, fue previamente precipitada (sección 4.1.3.1) y filtrada (Millipore 0,2 µm). La columna, una vez equilibrada con PBS, se cargó con 5,45 mg de suero. Las IgG adsorbidas se eluyeron con Buffer Glicina-HCl 0,1 M, pH 2,7. Cada ml del eluido se neutralizó con 100µl de Buffer Tris-HCl 0,1M, pH 9,0. Se analizó su pureza por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), en condiciones reductoras y teñido con Coomassie Blue R-250 (Bio-Rad, USA) (sección 4.1.3.4). Se determinó la actividad biológica de las fracciones eluidas, mediante ELISA. Se combinaron las fracciones con mayor concentración de IgGs y se las dializó exhaustivamente contra PBS. Mediante lectura espectrofotométrica, se determinó la concentración de IgG.

4.1.3.4. SDS-PAGE. (Laemmli, 1970): Realizados en condiciones estándares en cámara para electroforesis mini Protean II (Bio-Rad, USA). Brevemente, se usó geles separadores al 10% de poliacrilamida, preparados desde una Solución de

Acrilamida 30% T, 1,5% C. La polimerización se catalizó con 100 μ l de persulfato de amonio (PSA) (Sigma-Aldrich, USA) al 10% p/v y 6 μ l de N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Bio-Rad, USA). Luego de cargar la mezcla del gel resolutive, se cubrió la solución con 3ml de H₂O destilada. Una vez polimerizado, se cargó una solución de poliacrilamida al 4% p/v, preparado desde solución de acrilamida 30% T, 1,5% C (sección 4.3.1). La polimerización se realizó con un separador discontinuo. Previo a depositar las muestras en el gel, la cámara se llenó con Buffer de Corrida, las proteínas fueron denaturadas con Buffer de Carga (sección 4.3.1) y calentamiento a 100°C, durante 5 min y se agregó la muestra a cada pocillo del gel. La separación se realizó a 70 V durante el recorrido de la muestra por el gel concentrador y a 100 V a partir del inicio del gel separador, hasta que el marcador de corrida llegó al borde inferior del gel. Como estándar de masa molecular, se utilizó un marcador de peso molecular de proteína preteñido (sección 4.3.2). Las proteínas fueron teñidas con Azul de Comassie o transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham, UK).

4.1.3.5. Inmuno Western Blot (IWB). (Towbin y col. 1979) Las proteínas, separadas por SDS-PAGE, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham, UK), utilizando un sistema húmedo de transferencia horizontal Bio-Rad, USA (Mini-PROTEAN II Cell). Se aplicó un potencial de 100 V, a 4°C, durante 1 hora. Luego se bloquearon los sitios libres de la nitrocelulosa con PBS-Leche 5% durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas, con PBS-T, cada 5 minutos, por 4 veces, agitando constantemente.

Luego, las membranas se incubaron por 1,5 h a temperatura ambiente, con el anticuerpo de cabra anti-cadena pesada de IgG de conejo, conjugado a fosfatasa alcalina (Dako, Dinamarca), diluido 1/1000 en PBS-Leche 3%. Finalmente, como

sustrato de fosfatasa alcalina se utilizó 5-bromo- 4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) /azul de nitrotetrazolium (NBT) (Sigma-Aldrich, USA) y la reacción se detuvo con PBS/EDTA 2 mM.

4.2. Generar una Columna de Inmunoadinidad para Remover LPS.

4.2.1. Montaje de columna.

Se hizo un pool (1,83 mg/ml) con las fracciones más concentradas de inmunoglobulinas purificadas (sección 4.1.3) desde suero de conejo anti-LPS. Se usaron 4 ml del pool de IgG purificadas para armar una columna con volumen de 1 ml, se montó y operó la columna de Sefarosa activada con Bromuro de Cianógeno (sección 4.3.2) según las indicaciones del fabricante de la resina (Sigma-Aldrich, USA). La columna se mantiene a 4°C en una solución de PBS-Azida 0,005%.

4.2.2. Protocolo de remoción de LPS.

Primero se lavó la columna con 15 ml de PBS, se pasaron 10ml de Buffer Glicina-Tritón (sección 4.3.1) y se lavó nuevamente con 15 ml de PBS. Se cargó la muestra de LPS, diluida en PBS, y se hizo retroalimentación cuatro veces, recuperándose el frente. La columna se lavó con PBS 15ml y se recuperaron las fracciones. El LPS unido a la matriz fue eluído usando Buffer Glicina-Tritón (pH 2,5) (sección 4.3.1) y las muestras fueron recolectadas en tubos con 0,03 vol de Buffer Tris-HCl (50mM, pH 9,0) o volumen necesario para neutralizar el pH. La columna se lavó finalmente con PBS y se mantiene en PBS-Azida 0,005%.

4.2.3. Análisis de LPS en geles de poliacrilamida-SDS-Tricina.

4.2.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS-Tricina. (Lesse y col, 1990). Realizados en cámara para electroforesis mini Protean III (Bio-Rad, USA). Brevemente, se usó geles separadores al 14 % (p/v) de poliacrilamida, preparados desde una solución de Acrilamida 49,5% T, 6% C (sección 4.3.1). La polimerización se catalizó con 100 µl de persulfato de amonio (PSA) (Sigma-Aldrich, USA) al 10% p/v y 6 µl de TEMED (Bio-Rad, USA). La solución fue cargada entre dos vidrios con separadores de 1,5mm. El gel concentrador era 4% (p/v) poliacrilamida, preparado a partir de Acrilamida 49,5% T, 3% C (sección 4.3.1) La cámara de electroforesis se llenó con Solución Anódica pH 8,9 y Catódica pH 8,25 (sección 4.3.1). La electroforesis se realizó a 50 Volts mientras las muestras permanecían en el gel concentrador y a 150 Volts cuando éstas entraron en el gel separador, cuando el marcador de corrida cae, se corre por 15 minutos más.

4.2.3.2. Tinción con plata. (Tsai & Frasch 1982). Una vez retirado el gel de la cámara, se fijó durante toda la noche en Solución de Fijación (sección 4.3.1). Luego se trató con Solución de Oxidación (sección 4.3.1), por 10 min. Posterior al lavado con agua destilada, se tiñó el gel con Solución Argéntica (sección 4.3.1). Luego se lavó 3 veces con agua destilada y se detectó la presencia de LPS con Solución de Revelado (sección 4.3.1). La reacción se detuvo con agua d.d.

4.2.3.3 Inmuno Western Blot para detectar LPS. Se basa en modificaciones al método descrito en la sección 4.1.3.5. La transferencia se hizo a una membrana PVDF (Amersham Biosciences, UK) en Buffer Transferencia (sección 4.3.1), la membrana fue lavada previamente en metanol 100% por 10 segundos y luego en agua bidestilada por 5min. Se aplicó una corriente de 100 V durante 1 hora 20 minutos. Se

usó como anticuerpo primario inmunoglobulinas G purificadas desde suero inmune anti-LPS, en dilución 1/1000 y se incubó por 12 horas. La detección se realizó con anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo, conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma Immuno Chemicals, USA), diluido 1/1000 e incubado por 90 min.

4.2.4. Preparación de Calreticulina recombinante de *T. cruzi*.

La proteína recombinante utilizada en el desarrollo de esta tesis fue obtenida de la expresión de bacterias *E. coli* del plasmidio pET 28b(+)/TcCRT, el cual porta el gen de calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT), sin sus secuencias líder y KEDL. El vector pET 28b(+) incorpora a la molécula una secuencia de 6 histidinas en el extremo C terminal de TcCRT.

4.2.4.1. Expresión de rTcCRT. Brevemente, se cultivó la cepa de *E. coli* BL21(DE3) pLysS, transformada con el vector de expresión pET 28b(+)/TcCRT para la proteína rTcCRT, en 10 ml de medio Luria Bertani (LB) (sección 4.3.1) en presencia de los antibióticos de selección Cloranfenicol (34 mg/ml) y Kanamicina (50 mg/ml) a 37°C, agitando toda la noche. El pre-inóculo se agregó a 200 ml de LB con los antibióticos de selección, a 200 rpm y 37°C, hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento ($DO_{600}=0.5$). Posteriormente, se adicionó Isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) (Invitrogen, USA), a una concentración final de 1mM y se dejó agitando por 3 horas. Las bacterias se centrifugaron a 2300 g, por 20 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió con 10 ml de Buffer de Unión (sección 4.3.1) conteniendo un cóctel inhibidor de proteasas (Calbiochem, USA) y Tritón X-100 al 0.1% v/v (Sigma-Aldrich, USA) y se agitó, suavemente en vórtex. Luego de mezclar, se sonicó con 8 pulsos de 20 segundos, cada vez, a 50 W, alternando cada pulso con 30 segundos de incubación

en hielo. Se obtuvo una muestra aproximada de 12 ml. Luego se centrifugó a 10000 rpm / 10 minutos / 4°C, se recuperó el sobrenadante y se filtró (poros de 0,2 µm).

4.2.4.2. Purificación de rTcCRT. La purificación de rTcCRT se realizó, por cromatografía, utilizando la columna "His-Bind Resin" (Novagen, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, la columna, de 2,5 ml, almacenada en Buffer de Reconstitución (sección 4.3.1), fue lavada con 3 volúmenes de agua destilada, cargada con 5 volúmenes de NiSO₄ 50mM, y equilibrada con 7,5 ml de Buffer de Unión (sección 4.3.1). Se cargó la muestra con Buffer de Unión y se lavó con 50 ml de Buffer de Lavado (sección 4.3.1). Se eluyó la muestra con 7,5 ml de Buffer de Elución (sección 4.3.1), se recuperaron de 5-6 alícuotas de 1,5 ml. Se leyó a 280 nm. Todos los buffer estaban libres de ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA) (quelante de níquel).

La columna fue lavada y recuperada con Buffer de Reconstitución (sección 4.3.1) o EDTA 100 mM para eliminar el níquel del Buffer de Carga e imidazol del Buffer de Elución. Para su almacenamiento, fue regenerada siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, basado en diferentes soluciones de etanol.

4.2.5. Preparación de LPS bacteriano.

Se ajustó la D.O.₆₀₀ del cultivo bacteriano de interés en 2. Luego se centrifugó a 13000rpm por 2 min. y se resuspendió en 90µl de Buffer de Carga 3x (sección 4.3.1), se hirvió por 10 min. y se agregó 10µl de Proteinasa K (Novagen, USA). Finalmente, se incubó a 60°C por 60 min.

4.3. Materiales

4.3.1. Soluciones.

ABTS: 500 ml de Buffer citrato-fosfato con 2,74 mg de ABTS, se alicuotó y guardó a -20°C. Antes de agregar a la placa de ensayo se agregó 1 μ l de H₂O₂ 30% por cada ml de solución de ABTS.

Acrilamida 30% T, 1,5% C: 29,2gr de acrilamida con 0,8gr de bis-acrilamida, se completó volumen hasta 100 ml. Luego la solución se filtró y se guardó en envase ámbar a 4°C.

Acrilamida 49,5% T, 3% C: 48gr de Acrilamida con 1,5gr de bis-acrilamida, se completó volumen a 100ml con agua d.d., enrasó y guardó en envase ámbar a 4°C.

Acrilamida 49,5% T, 6% C: 46,5gr de Acrilamida con 3gr de bis-acrilamida, se completó volumen hasta 100ml con agua d.d., enrasó y guardó en envase ámbar a 4°C.

Buffer Carbonato: Se preparó separadamente una solución 0,5M de Na₂CO₃ pH 9,5 y una solución 0,5M de NaHCO₃ pH 9,6 en agua bidestilada. Se mezclaron luego 450 μ l de la primera y 1.050 μ l de la segunda y se llevó a 15 ml con agua bidestilada.

Buffer de Carga 3x: 1,9 ml de Tris 1M pH 6,8, 3 ml de Glicerol, 1,5 ml de β -mercaptoetanol, 3 ml de SDS al 20%, 100mg de azul de bromofenol y 600 μ l de agua. Una vez disuelto se alicuotó de 0,5 ml y se almacenó a -20°C.

Buffer de Elución 4x: Imidazol 4M, NaCl 2M y Tris 80mM, pH 7,9.

Buffer de Lavado 8x: Imidazol 480mM, NaCl 4M y Tris 160mM, pH 7,9.

Buffer de Reconstitución 4x: EDTA 400mM, NaCl 2M y Tris 80mM, pH 7,9.

Buffer de Unión 8x: Imidazol 40mM, NaCl 4M y Tris 160mM, pH 7,9.

Buffer Glicina- Tritón (pH 2,5): 0,37gr de Glicina, 0,88gr de NaCl, y 100 µl de Tritón X-100 pH 2,5, se completó volumen hasta 100ml con agua bidestilada.

LB (Caldo Luria Bertani): 10 g NaCl, 5 g Extracto de levadura, 10 g Triptona, se completó volumen hasta 1l. Se ajustó el pH a 7,0.

PBS 10x: 3gr de fosfato dihidrógeno de sodio, 29gr de fosfato monohidrogenado disódico y 90gr de cloruro de sodio, pH 7,2, se completó volumen de 1l con agua desionizada. Mantención a temperatura ambiente.

Solución Anódica: Tris 0,2M pH 8,9.

Solución Argéntica: 2,8ml NaOH 1M, 1g AgNO₃, 2ml NH₃ 25%v/v, enrasar a 150ml.

Solución Catódica: Tris 0,1M/ Tricina 0,1M con 0,1% SDS, se ajustó pH a 8,25.

Solución de Fijación: en agua, 40% v/v de Etanol absoluto, 10% v/v de ácido acético glacial.

Solución de Oxidación: en agua, 40% v/v de Etanol absoluto, 10% v/v de ácido acético glacial y 0,7% p/v de ácido periódico

Solución de Revelado: 12,5mg de ácido cítrico monohidratado, 125µl de formaldehído 37%. Enrasar a 250ml.

4.3.2. Reactivos comerciales.

Clasificados según compañía de origen.

Amersham-Biosciences: marcador preteñido proteína bajo rango Rainbow® (RPN-755), membrana nitrocelulosa Hybond®; membrana PVDF Hybond-P®.

Bio-Rad: β -mercapto etanol; persulfato de amonio; acrilamida; bis-acrilamida; marcador preteñido proteína bajo rango (161-0305); Coomassie Blue R-250; azul de bromofenol.

Calbiochem: Cóctel inhibidor de proteasas.

Cambrex: lisado de amebocito limulus Pyrogen[®] Plus Single Test Kit.

Dako: anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado a fosfatasa alcalina; anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a fosfatasa alcalina; anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado a peroxidasa.

GE Healthcare: Sefarosa Proteina G 4Fast Flow[®].

Immunological Research: anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado a biotina.

Invitrogen: IPTG.

Merck: HCl fumante; ácido acético glacial; metanol p.a.; etanol p.a.; NiSO₄; NaCO₃; NaHCO₃; Tris; Imidazol; Glicina; AgNO₃; ácido periódico, formaldehído.

Novagen: His-Bind Resin; Proteinasa K.

Sigma-Aldrich: Lipopolisacárido de *E. coli* O26:B6, sefarosa activada con bromuro de cianógeno; 5-bromo, 4 cloro 3-indolil fosfato; estreptavidina-peroxidasa; Tricina; ácido periódico; Tween-20; Tritón X-100.

Sigma Immuno Chemicals: anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina.

Spectrum: membrana tubular de diálisis 3,5 kDa.

US Biological: albumina de suero bovino.

Winkler: marcador preteñido proteína amplio espectro (BM-1110); Tris; Glicina; NaCl.

4.3.3. Reactivos LIAM

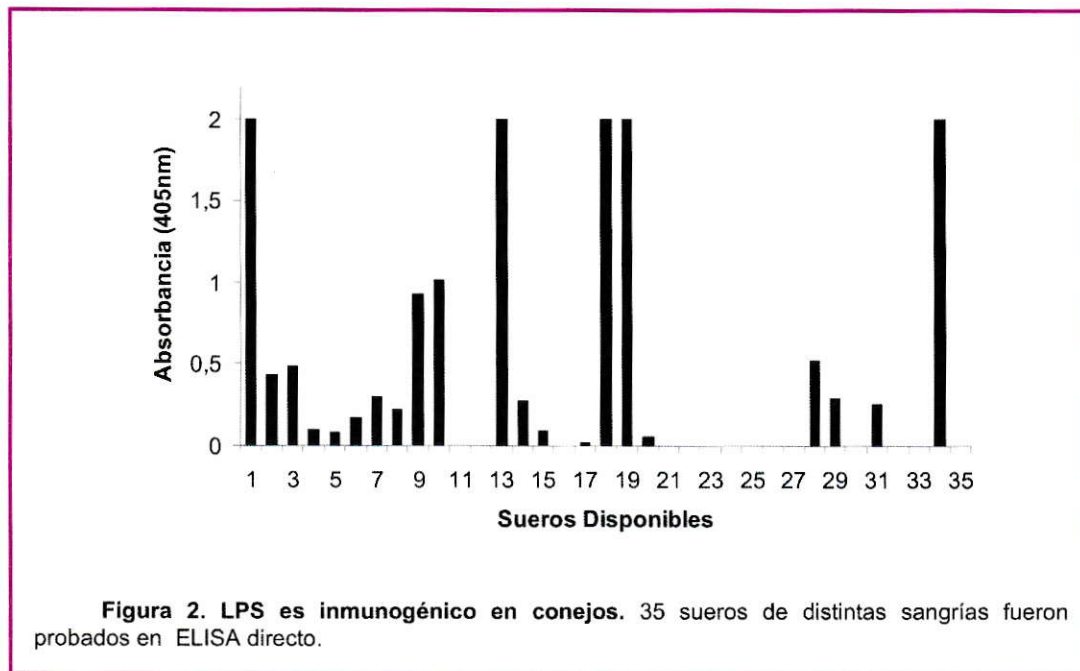
Anticuerpo anti-BSA, Anticuerpo monoclonal anti-rTcCRT (E2G7), cepa de *E. coli* BL21(DE3) pLysS, transformada con el vector de expresión pET 28b(+)/TcCRT para la proteína rTcCRT.

5. RESULTADOS

5.1. Desarrollo y Estandarización de Ensayo ELISA para Cuantificar Lipopolisacaridos.

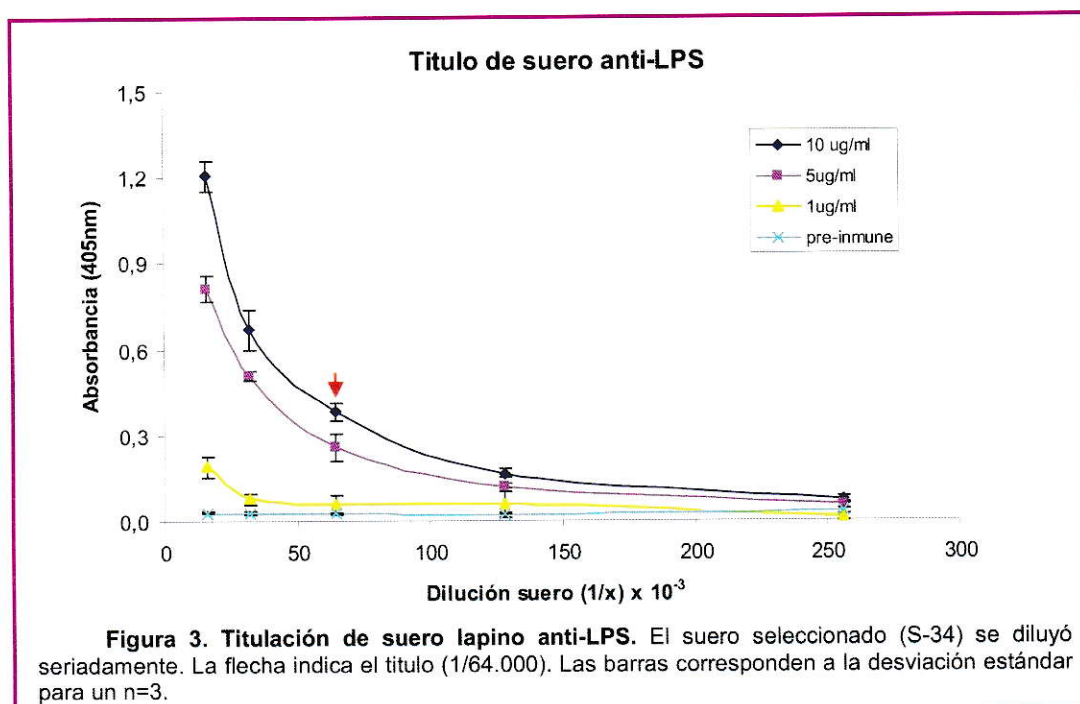
5.1.1. Evaluación de sueros lapinos anti-LPS.

Se disponía de 35 tubos de sueros lapinos anti-LPS (desarrollados por Leonardo Paredes, Memoria de Título para optar al grado de médico veterinario, (Paredes, 1995), y se evaluó su reactividad frente al antígeno, mediante un ensayo tipo ELISA (sección 4.1.1). La **Figura 2** muestra 5 sueros con mayor reactividad con LPS. De estos se seleccionó el suero 34 (S-34), por su mayor disponibilidad.



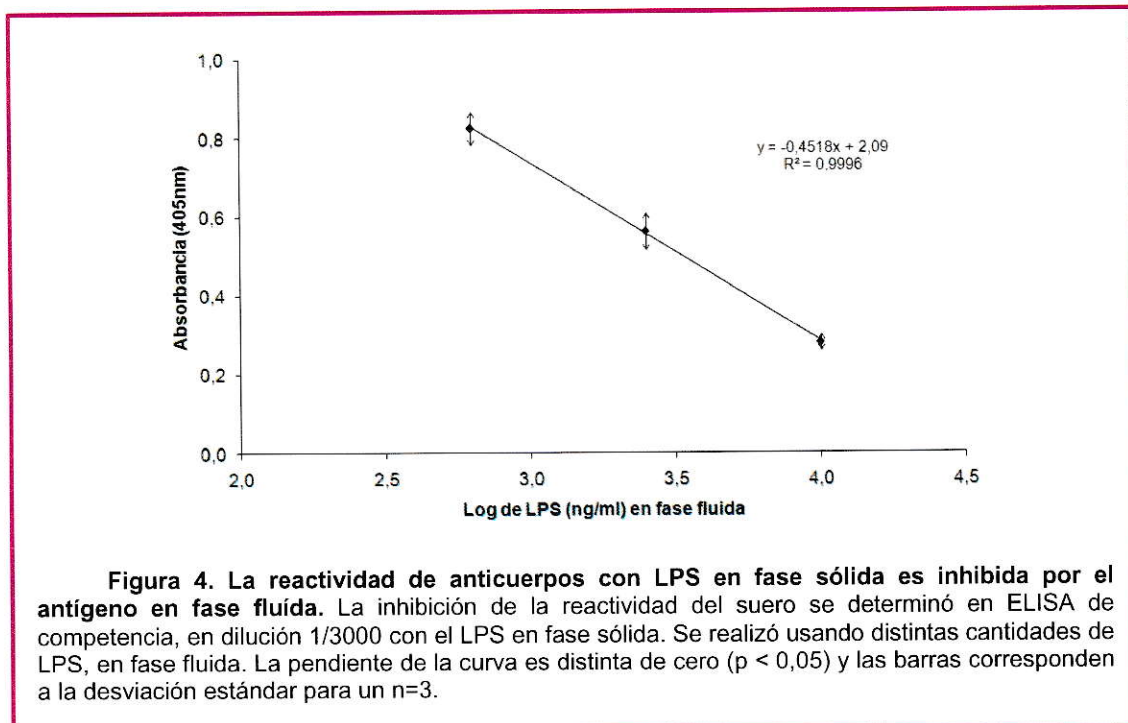
Lo primero fue determinar el título del suero seleccionado junto con la cantidad de LPS mínima necesaria para trabajar, de modo de abaratar costos y que otorgase

una lectura clara. El suero se preparó en diluciones desde 1/4.000 hasta 1/256.000 y se analizó su reactividad por ELISA (**Figura 3**), frente a tres concentraciones distintas de LPS (10, 5 y 1 $\mu\text{g/ml}$). A partir de este experimento se decide sensibilizar las placas de ELISA con una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, equivalente a 0,5 μg totales de la endotoxina por pocillo. Así se determinó un título de 1/64.000 para este suero, usando Prueba t de student, para discriminar estadísticamente de la línea base, obtenida a partir del suero preinmune ($p < 0,05$).



Luego, verificamos que este reconocimiento es afectado cuando preincubamos los sueros con LPS en fase fluida. Para esto se realizó un ELISA (sección 4.1.2), donde los sueros, diluidos 1/3000, fueron preincubados con distintas cantidades de LPS (**Figura 4**). En la curva estándar generada, vemos que la interacción anticuerpo-

antígeno en fase sólida se ve disminuida en forma dosis dependiente, dado que la pendiente es significativamente diferente de cero ($p < 0,05$). Así, comprobamos que es posible intervenir la interacción antígeno-anticuerpo y que, en teoría, sería posible determinar la presencia de LPS en muestras problemas. Como primera aproximación, se determinó la sensibilidad de S-34 para la detección de LPS en solución en $0,6 \mu\text{g/ml}$, al usar una dilución del suero de $1/3000$.



5.1.2. Purificación de Inmunoglobulinas totales desde suero policlonal anti-LPS.

Con el objetivo de mejorar el reconocimiento del LPS y facilitar el desarrollo de la columna de extracción de éste, se precipitaron y purificaron (sección 4.1.3) las inmunoglobulinas de clase G presentes en el suero de conejo (S-34). Las inmunoglobulinas (**Figura 5, A y B**) obtenidas, correspondientes a las fracciones 21-25

de la purificación, tuvieron una pureza aceptable con escasa contaminación con IgM y, como se verificó por IWB, son de clase G, y además reconocen LPS en el contexto de un ELISA (**Figura 5C**).

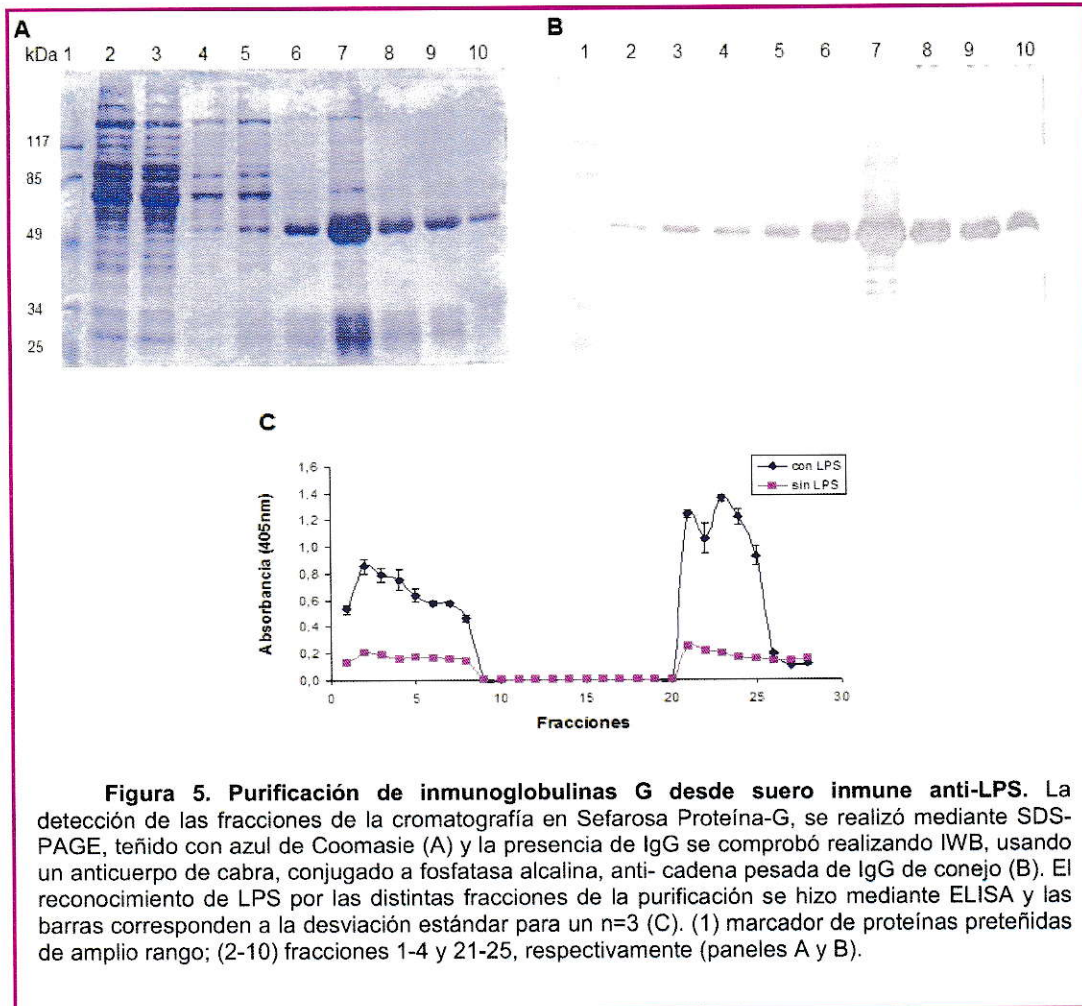
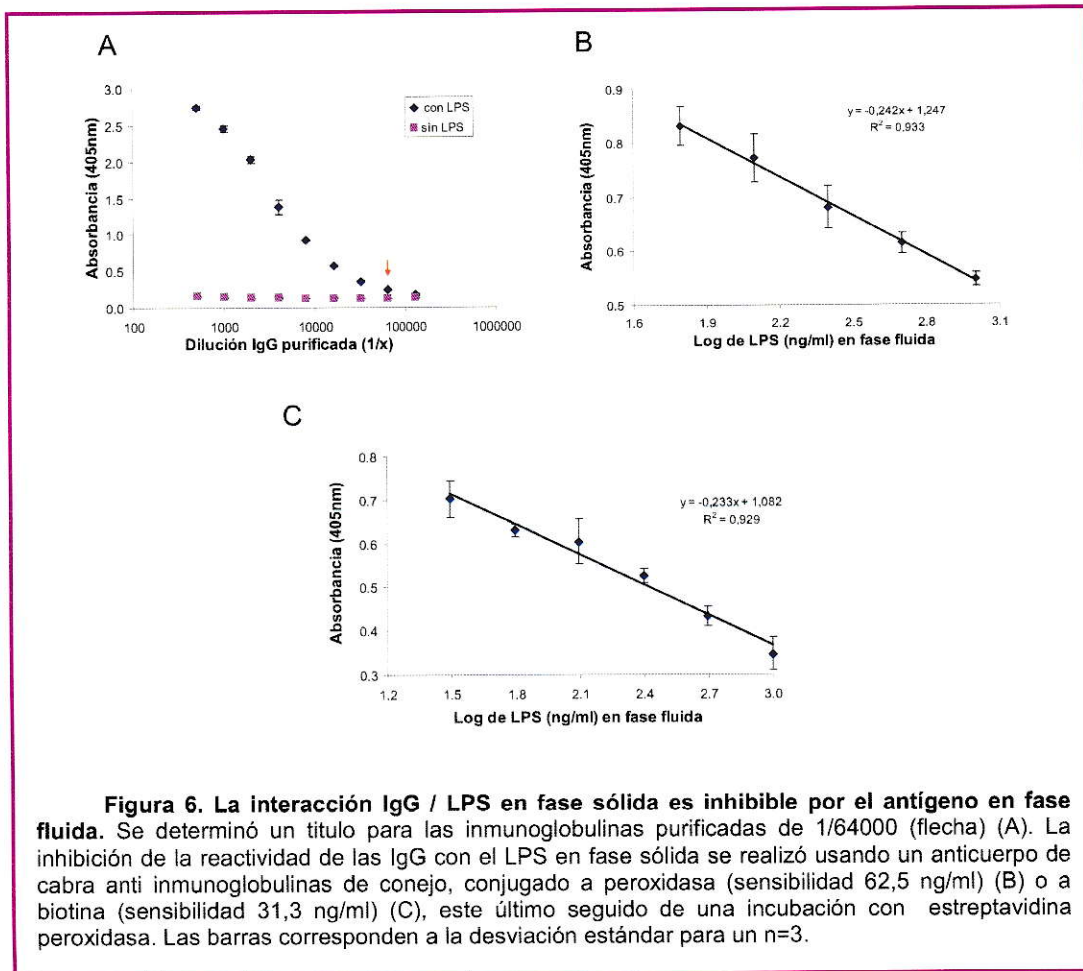


Figura 5. Purificación de inmunoglobulinas G desde suero inmune anti-LPS. La detección de las fracciones de la cromatografía en Sefarosa Proteína-G, se realizó mediante SDS-PAGE, teñido con azul de Coomassie (A) y la presencia de IgG se comprobó realizando IWB, usando un anticuerpo de cabra, conjugado a fosfatasa alcalina, anti- cadena pesada de IgG de conejo (B). El reconocimiento de LPS por las distintas fracciones de la purificación se hizo mediante ELISA y las barras corresponden a la desviación estándar para un n=3 (C). (1) marcador de proteínas preteñidas de amplio rango; (2-10) fracciones 1-4 y 21-25, respectivamente (paneles A y B).

Las fracciones 1 a 20 se descartaron por su baja cantidad de IgG y alta contaminación con otras proteínas (IgM, albúmina, entre otras). Con las IgGs purificadas, fracciones 21-25, se desarrolló una columna de remoción de LPS por inmunoadfinidad (sección 5.3) y un ELISA de competencia (sección 5.1.3) para detectar concentraciones desconocidas de LPS en soluciones relevantes.

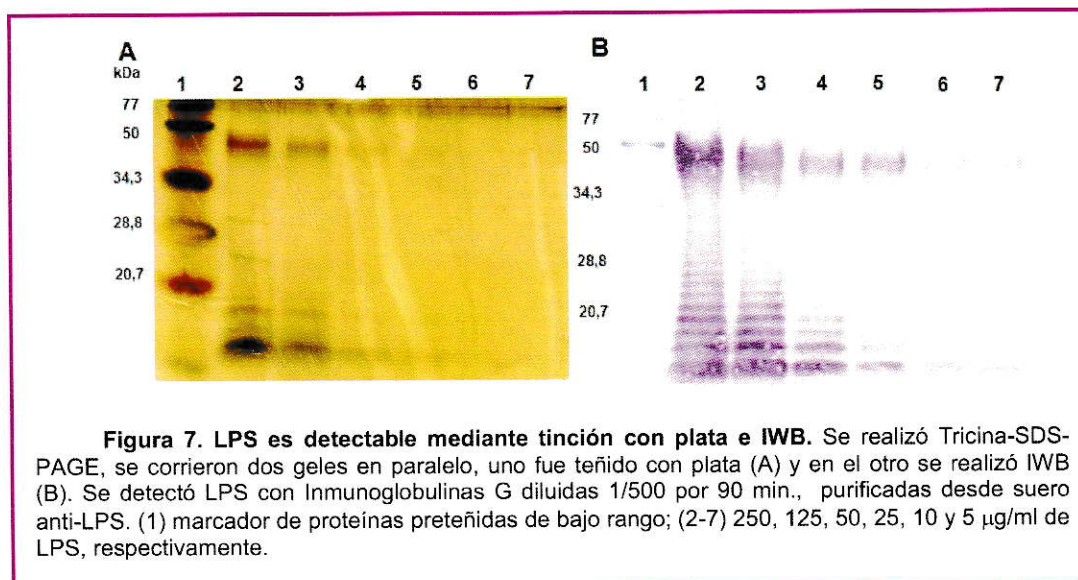
5.1.3. Construcción de una curva estándar para detección de LPS.

Las IgG purificadas tuvieron un título de 1/64.000 (**Figura 6A**). Para una intensidad de señal de 70%, se trabajó con una dilución de anticuerpo de 1/1.500. Luego, se estandarizó el ELISA de competencia (sección 4.1.2), con algunas variaciones, con una sensibilidad de detección de LPS en solución de 62,5 ng/ml (**Figura 6B**), usando como anticuerpo secundario inmunoglobulinas conjugadas a peroxidasa, o de 31,3 ng/ml, al usar anticuerpos conjugados a biotina, detectando con estreptavidina-peroxidasa (**Figura 6C**). En ambos casos se obtuvo que la pendiente es significativamente distinta de cero ($p < 0,05$)



5.2. Detección de LPS en Muestras Problemas, usando un Método Alternativo a ELISA.

Luego, desarrollamos un método cuantitativo para estimar la eficiencia de nuestro procedimiento para remover LPS. La **Figura 7** muestra la detección, mediante IWB, de LPS comercial, en concentraciones conocidas. Se corrieron dos geles en paralelo (sección 4.2.3.1). Uno de ellos se tiñó con plata (Tsai & Frasch 1982) (**Figura 7A**) (sección 4.2.3.2) y el otro, se transfirió por 1 hora a una membrana PVDF (sección 4.2.3.3) y la detección se realizó mediante IWB (**Figura 7B**), incubando con las inmunoglobulinas G lapina purificada, en una dilución 1/500 por 90 minutos. Luego se incubó con anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo, conjugados a fosfatasa alcalina, diluidos 1/1500. El límite de detección de LPS para la tinción con plata fue de 25 $\mu\text{g/ml}$, equivalentes a 500 ng totales de LPS. Para la detección por IWB el límite alcanzó los 5 $\mu\text{g/ml}$, equivalentes a 100 ng totales de la endotoxina.



En la **Figura 8** se observa la curva de calibración del LPS total presente en los carriles 2 al 6 del IWB de detección del LPS (**Figura 7B**). Usando el programa computacional Gel-Pro Analyzer se determinó la densidad promedio de la banda de aproximadamente 10kDa, representativa del LPS total presente en cada carril, y detectable cuando la cantidad de LPS es menor, en esta ocasión se dejó fuera el carril 7, ya que la determinación de la densidad quedó fuera del rango de linealidad. La concentración de LPS detectado corresponde a 250, 125, 50, 25 y 10 $\mu\text{g/ml}$. Por lo tanto, en este primer esfuerzo, la sensibilidad de este ensayo alcanzó a 200ng totales, es decir, una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS.

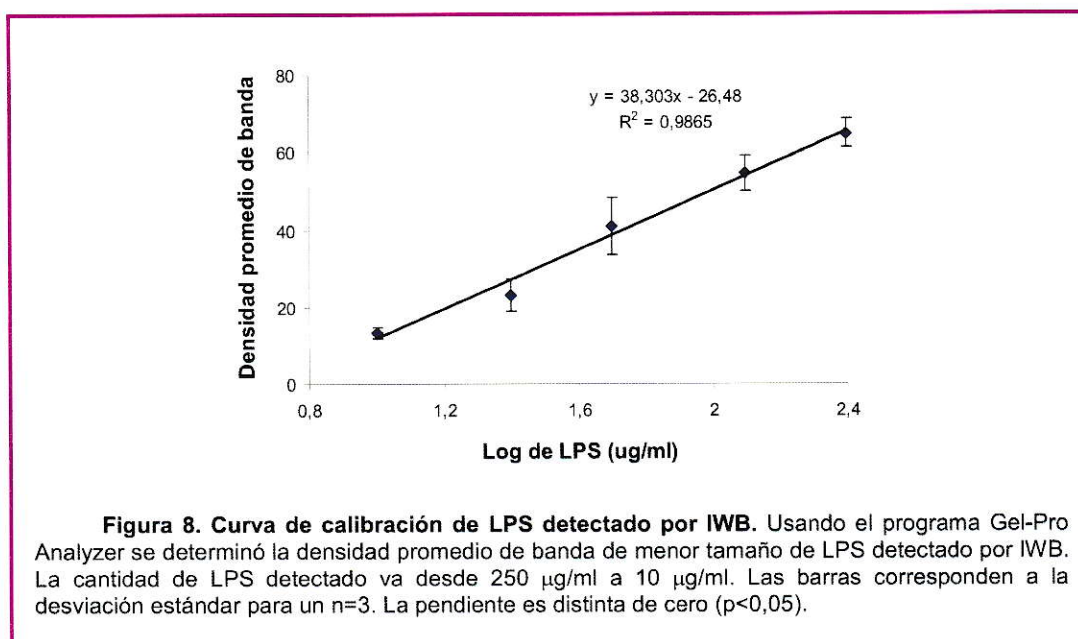
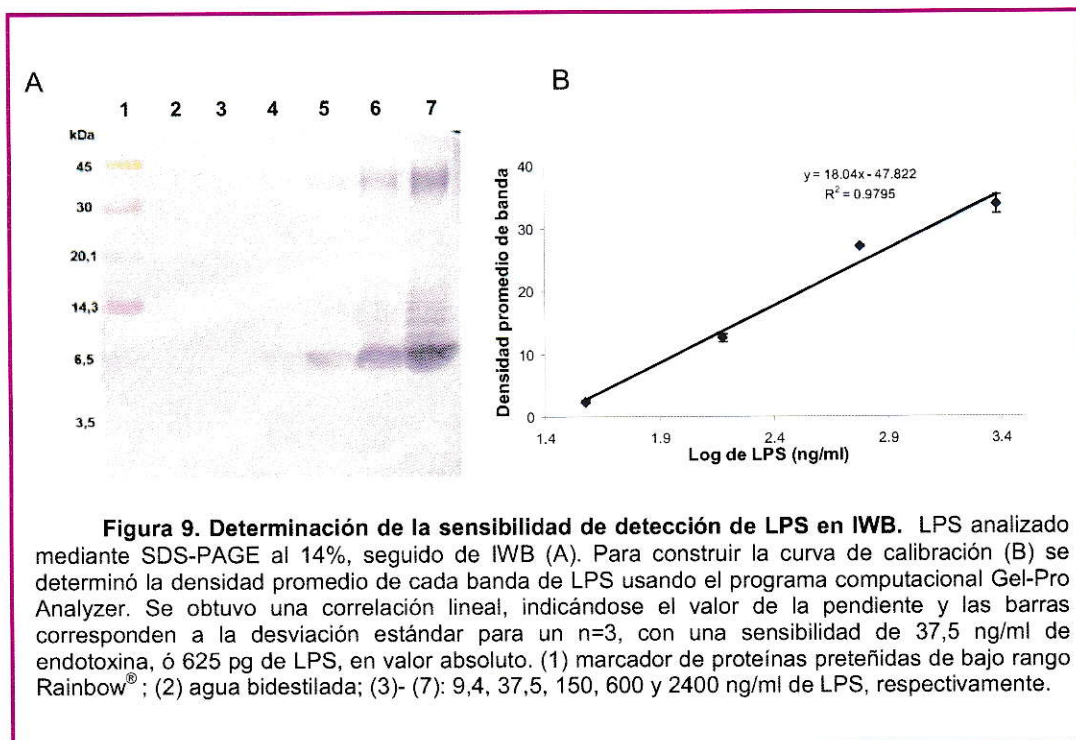


Figura 8. Curva de calibración de LPS detectado por IWB. Usando el programa Gel-Pro Analyzer se determinó la densidad promedio de banda de menor tamaño de LPS detectado por IWB. La cantidad de LPS detectado va desde 250 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$. Las barras corresponden a la desviación estándar para un $n=3$. La pendiente es distinta de cero ($p<0,05$).

Luego, se diseñó un nuevo IWB, esta vez usando una cantidad menor de LPS con el objetivo de mejorar su sensibilidad para usarlo en la detección y cuantificación de LPS presentes en muestras problemáticas (**Figura 9A**). La sensibilidad alcanzó a 37,5 ng/ml, ó 625pg totales de la endotoxina. Al graficar el promedio de la densidad de la

banda de menor peso molecular (**Figura 9B**), determinado por el programa computacional Gel-Pro Analyzer, vemos que hay correlación lineal entre el logaritmo en base 10 de la cantidad de LPS medida en ng/ml y la densidad de la banda.

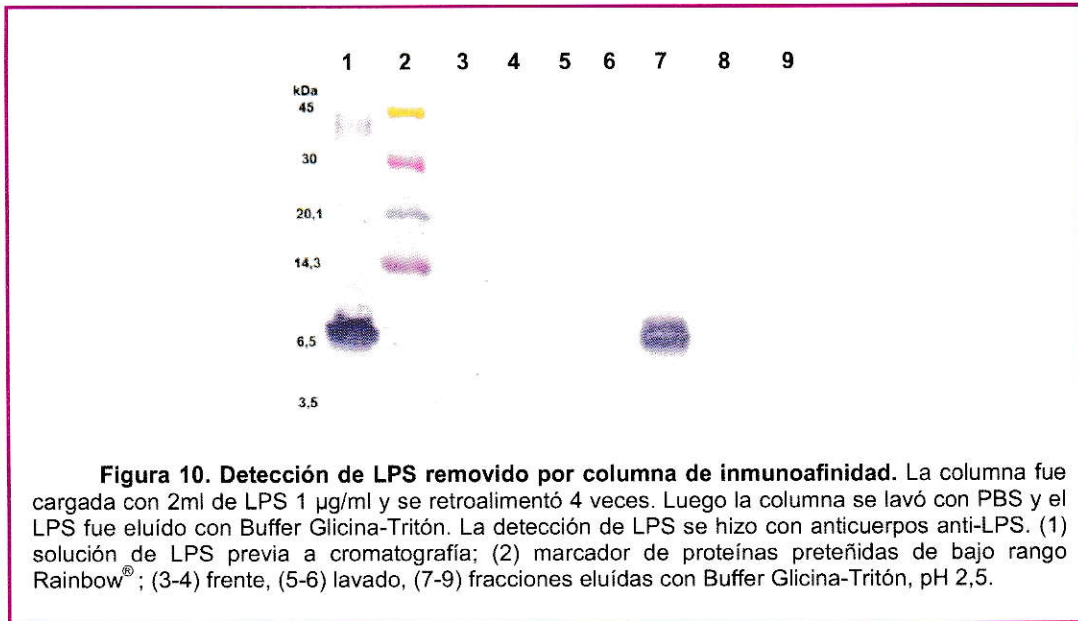


5.3. Remoción de LPS.

5.3.1. Remoción de LPS desde soluciones no proteicas.

Usando las inmunoglobulinas G anti-LPS, purificadas desde el suero policlonal de conejo, se diseñó una columna de remoción por inmunofinidad. Ésta fue probada usando soluciones con distintas concentraciones de LPS comercial (Sigma, USA). La cromatografía se realizó usando 2ml de LPS 1 μ g/ml y siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.2.2. La **Figura 10** muestra el IWB que se realizó como control de la cromatografía para detectar el LPS presente en la solución original (carril 1), en las

fracciones del frente (carriles 3-4), del lavado (carriles 5-6) ó eluídas con Buffer Glicina-Tritón X-100 (carriles 7-9).

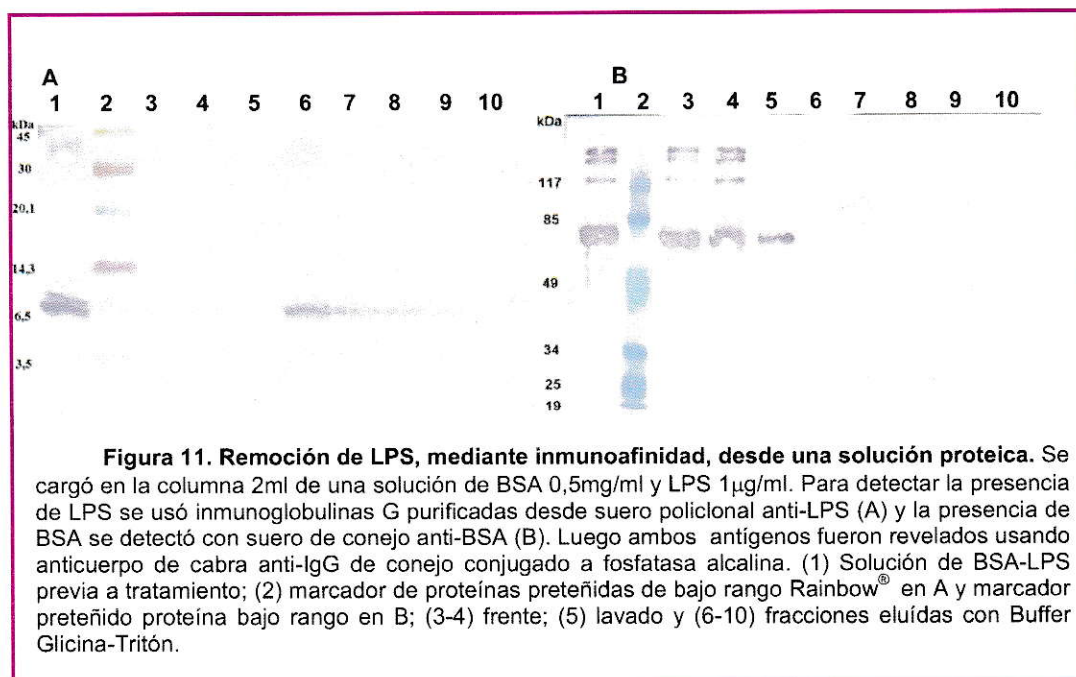


5.3.2. Remoción de LPS desde soluciones proteicas.

5.3.2.1. Remoción de LPS presente en solución de BSA.

Para realizar este ensayo se preparó 2 ml de PBS 1x conteniendo 0,5mg/ml de BSA (proteína comercial). La proteína contiene $\leq 2\text{EU/ml}$ ($\leq 200\text{ pg/ml}$), de endotoxina según indicaciones del fabricante. Además, a esta solución se agregó LPS comercial (Sigma, USA) de modo que su concentración final fuera de 1 µg/ml. Esta solución fue cargada en la columna y retroalimentada 4 veces. La **Figura 11** muestra el resultado del IWB para las fracciones obtenidas de esta cromatografía, se ensayó por separado la presencia de LPS (**Figura 11A**) y de BSA (**Figura 11B**). En ambos casos el carril 1

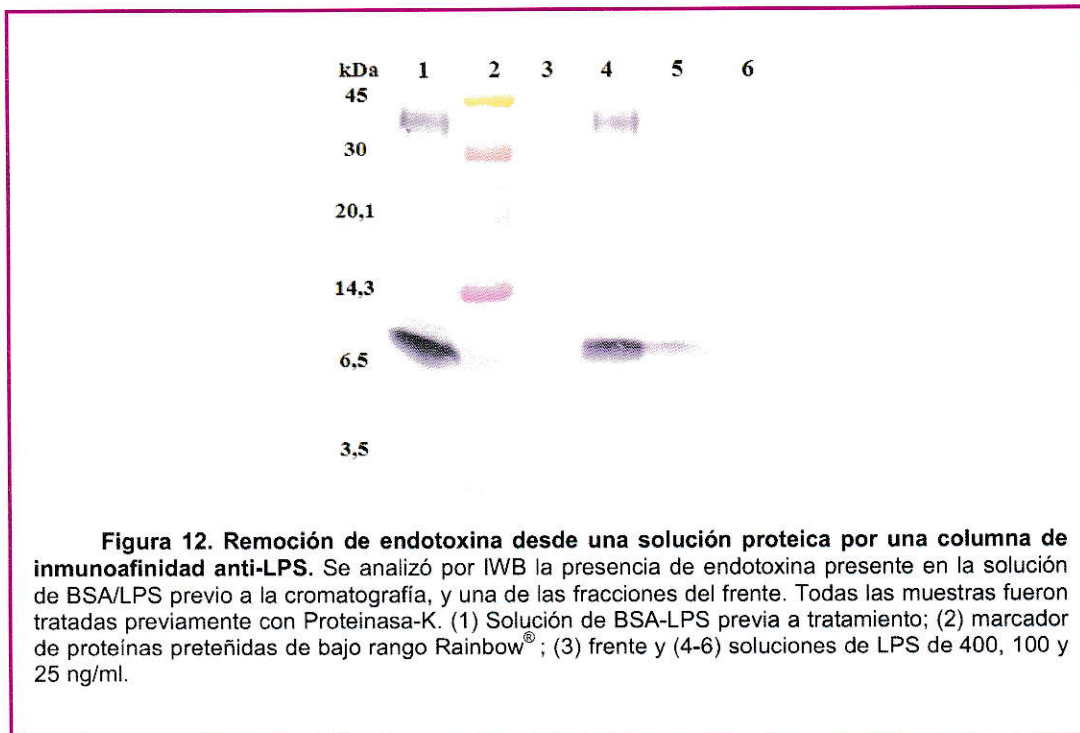
corresponde a la solución de BSA-LPS previa al tratamiento; los carriles 3-4, frente; el 5, lavado y 6-10 a las fracciones eluídas con Buffer Glicina-Tritón.



La determinación de la concentración de BSA en el frente se hizo por el método de Bradford (sección 4.1.3.2). Las fracciones del frente (**Figura 11B**, carriles 3 y 4), de 1,25 ml cada una, tenían una concentración de 0,36 mg BSA/ml. La fracción 3 (primer lavado), tuvo una concentración de proteína bajo la sensibilidad de la técnica (<0,2 mg BSA/ml) (**Figura 11B**, carril 5). El total de proteína recuperada fue 0,9 mg BSA.

Para determinar la concentración remanente de LPS en las fracciones con mayor concentración de BSA se usó, como primera aproximación, el método de IWB desarrollado en esta Memoria de Título, seguido de determinación por método LAL. La figura 12 muestra la detección de LPS presente en la solución de BSA/endotoxina previo al tratamiento (**Figura 12**, carril 1) y luego de remover el LPS (**Figura 12**, carril 3), los carriles 4-6 de la misma figura corresponden a 400, 100 y 25 ng de LPS/ml,

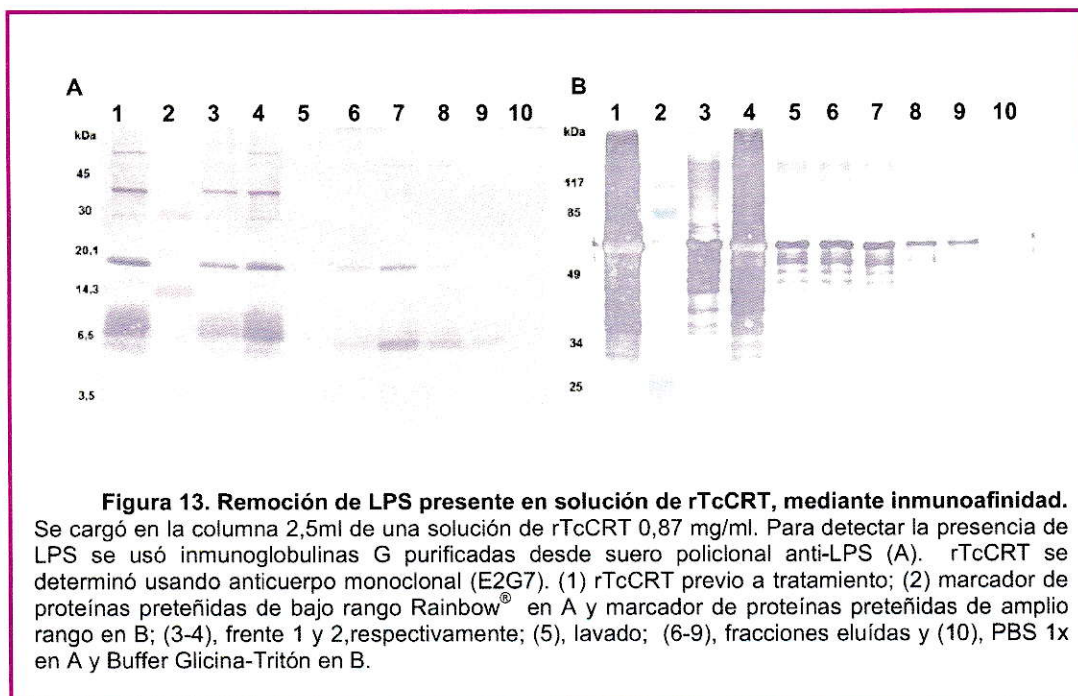
respectivamente. Con estos resultados se verificó que la concentración de LPS presente en la preparación de BSA disminuyó desde 1 µg/ml hasta menos de 25 ng/ml (equivalente a una eficiencia de purificación de 97,5%). Al analizar la presencia de LPS en la proteína recuperada, por el método LAL, se determinó para el frente (**Figura 11A**, carriles 3 y 4) una concentración de endotoxina de 250 y 177EU/ml (equivalente a 25 y 17 ng/ml), respectivamente, con esto se comprueba una eficiencia de remoción entre 97,5% y 98,3%. . El resto de las fracciones no fueron analizadas por LAL, debido al costo de cada análisis.



5.3.2.2. Remoción de LPS presente en solución de rTcCRT.

Se usó una solución de proteína recombinante de interés para nuestro laboratorio (rTcCRT). La preparación de esta proteína se describe en la sección 4.2.4. El ensayo se realizó usando 2,5 ml de una solución de 0,87 mg/ml de rTcCRT, con

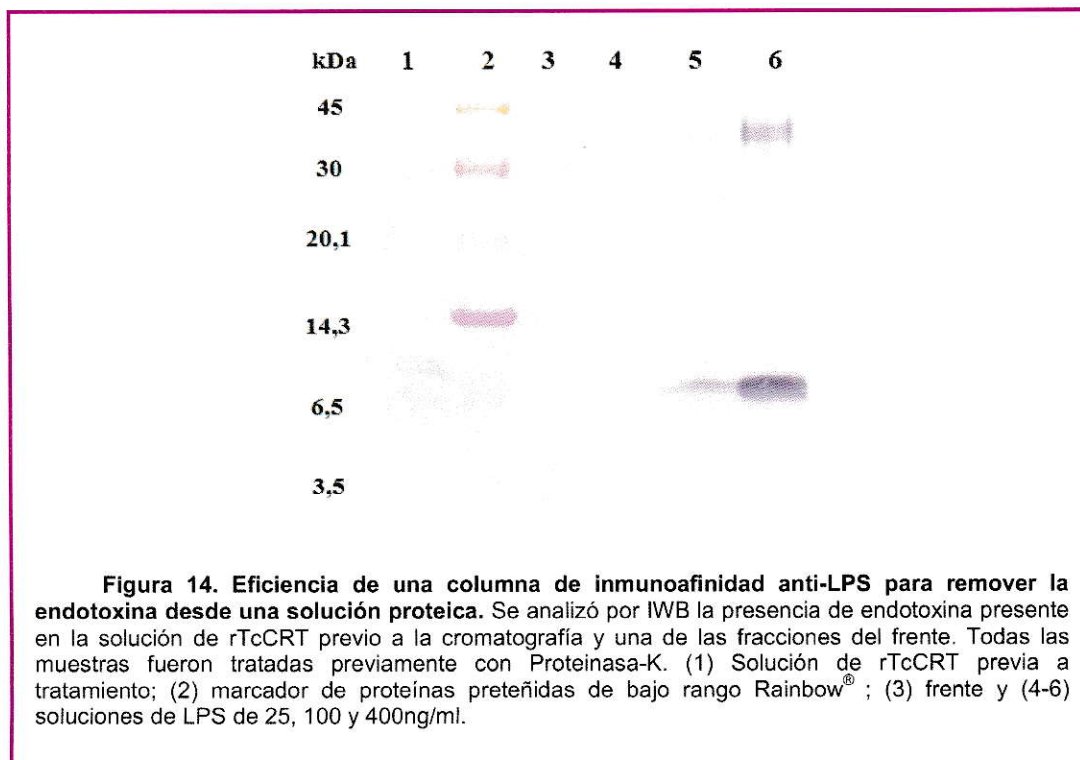
concentración desconocida de endotoxinas. La solución se cargó en la columna y fue retroalimentada 4 veces. La **Figura 13** muestra el IWB para la detección de LPS (**Figura 13A**) y la detección de rTcCRT (**Figura 13B**), en las distintas fracciones obtenidas desde la cromatografía. En A y B, el carril 1 corresponde a la solución previa al tratamiento, los carriles 3-4, al frente; el 5, al lavado y 6-9 a las fracciones eluidas. El carril 10 corresponde a PBS 1x en **A** y a Buffer Glicina-Tritón en **B**.



Se determinó por método de Bradford (sección 4.1.3.2), la concentración de rTcCRT en las fracciones correspondientes al frente 1 (0,43 mg/ml), frente 2 y eluidas (<0,2 mg/ml) (**Figura 13B**, carriles 4, 3 y 5-9, respectivamente). El total de proteína recuperada fue de 0,99 mg.

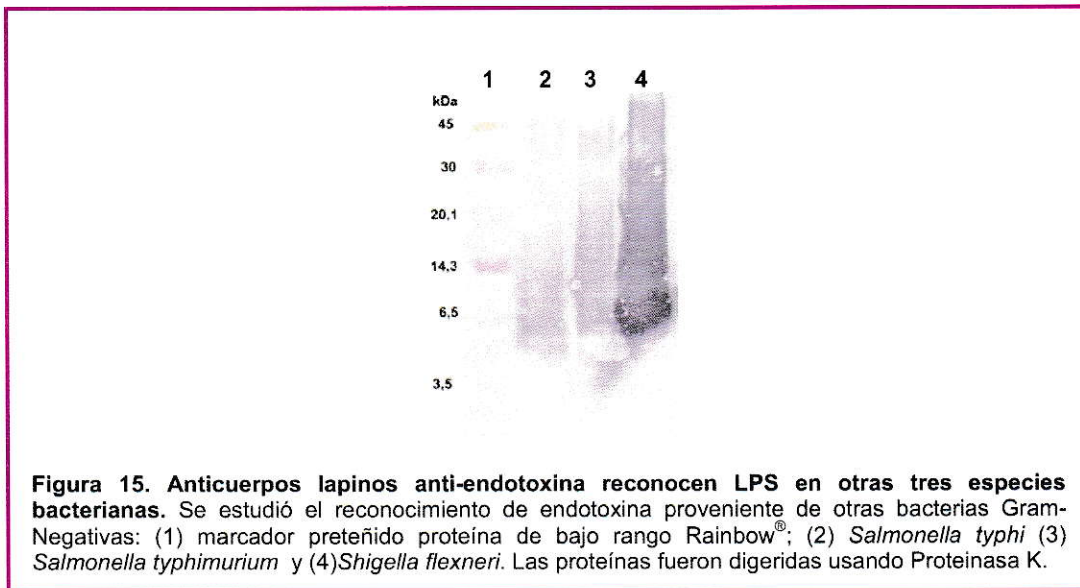
La determinación de la concentración remanente de LPS en las fracciones con mayor concentración de rTcCRT se hizo con el método de IWB desarrollado en esta

Memoria de Titulo, seguido de determinación por método LAL. La figura 14 muestra la detección de LPS presente en la solución de rTcCRT previo al tratamiento (**Figura 14**, carril 1) y luego de remover el LPS (**Figura 14**, carril 3), los carriles 4-6 de la misma figura corresponden a 25, 100 y 400ng/ml de LPS comercial, respectivamente. Con estos resultados se determinó que la concentración de endotoxina presente en la preparación de rTcCRT disminuyó su concentración desde 200 ng/ml a menos de 25 ng/ml (equivalente a una eficiencia de 87,5%). Al determinar la concentración de LPS por el método LAL, en la proteína recuperada en la fracción correspondiente al frente 1, se estableció que correspondía a 350EU/ml (equivalente a 35 ng/ml), con esto la eficiencia alcanzaría a 82,5%. El resto de las fracciones no fueron analizadas por LAL, debido al costo de cada análisis y a que poseían una cantidad despreciable de proteína.



5.4. Reconocimiento de LPS de otras bacterias Gram-negativas.

Finalmente, se determinó la capacidad de las Inmunoglobulinas G, purificadas desde un suero de conejo anti-LPS, de reconocer LPS de otras bacterias Gram-negativas. Es necesario indicar que la inoculación de los conejos para la generación del suero anti-LPS se realizó usando como antígeno LPS comercial de *Escherichia coli* (O26:B6, Sigma, St Louis, MO, USA). La **Figura 15** muestra el resultado para el IWB de detección de LPS presente en cultivos O.N. de 3 bacterias Gram-Negativas distintas. El reconocimiento es positivo para las 3 bacterias estudiadas: *Salmonella typhi* en carril 2, *Salmonella typhimurium* en carril 3 y *Shigella flexneri* en carril 4.



6. DISCUSION

Las endotoxinas han demostrado ser contaminantes frecuentes en preparaciones de proteínas recombinantes producidas en bacterias así como las provenientes de otras fuentes. La Biotecnología nos ha otorgado la capacidad de buscar nuevos tratamientos para enfermedades, y la eficacia de sus técnicas nos permite que estos tengan la pureza requerida y estén libres de agentes que puedan provocar efectos no deseados o tóxicos.

Con este plan en mente hemos propuesto desarrollar un método que nos permita remover el LPS presente en soluciones proteicas, con las menores pérdidas posibles. Para esto, la inmunoafinidad ofrece posibilidades interesantes, por su relativa simplicidad y bajo costo. También, hemos propuesto usar los mismos anticuerpos para desarrollar un método que permita la detección de picogramos por ml de LPS de manera cualitativa y cuantitativa, y que sea más conveniente que el ensayo LAL, el más usado en la actualidad, a pesar de su elevado costo.

En primer lugar, fue necesario titular los sueros lapinos anti-LPS, en ensayos tipo ELISA directo (Figura 2), se probaron todos los sueros disponibles en idénticas diluciones. Se obtuvo un mejor reconocimiento del LPS con el suero 34, representado por una mayor absorbancia (405nm), además que teníamos más volumen disponible.

En este trabajo definiremos, como título de un suero inmune, aquella dilución que genera una señal estadísticamente superior a aquella generada por su contraparte

preimmune, probada en la misma dilución. Se determinó el título del suero seleccionado en 1/64.000 (Figura 3). La reactividad del suero con una concentración de 10 μ g/ml de LPS fue similar a aquella obtenida con 5 μ g/ml de la endotoxina, mientras que con 1 μ g/ml las señales obtenidas fueron marginales. Por ello, se decidió trabajar con 5 μ g/ml de LPS, para no afectar la sensibilidad y rendimiento de los ensayos. Para los objetivos deseados, se probó en ELISA de competencia (Figura 4) que es posible suprimir el reconocimiento del LPS presente en fase sólida al incubar los anticuerpos previamente con LPS en fase fluida.

Para evitar alteraciones mediadas por otras proteínas existentes en el suero (principalmente complemento), se purificó las inmunoglobulinas G. Para verificar que las inmunoglobulinas purificadas conservaron su funcionalidad, se realizó un ELISA directo contra LPS (Figura 5). Así se obtuvo IgG total con pureza superior al 90% (Figura 5, A y B) y con reactividad frente a LPS de fase sólida (Figura 5C). Las Ig G purificadas tuvieron un título de 1/64000 (Figura 6A) y la dilución para realizar los ensayos de inhibición se estandarizó en 1/1500, suficiente para generar el 70% de la reactividad máxima. Se determinó la presencia de la endotoxina en preparaciones con concentraciones conocidas y se obtuvo linealidad entre 1 μ g/ml y 62,5 ng/ml, cuando se usó un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (Figura 6B). Con la purificación de las IgG se mejoró la sensibilidad en un orden de magnitud, ya que en la primera aproximación con el suero completo se obtuvo una sensibilidad de detección de LPS de 0,6 μ g/ml. Aunque los valores de la curva estándar son aplicables a soluciones con concentraciones de LPS superiores a lo recomendado por las farmacopeas disponibles, son útiles para cuantificar importantes remociones de la endotoxina.

Con el fin de mejorar la sensibilidad de la técnica se decidió usar el mismo ensayo, pero usando un anticuerpo secundario conjugado a biotina, seguido de una incubación con estreptavidina-peroxidasa. Así, esperábamos aumentar la sensibilidad por lo menos en un orden de magnitud, pero la linealidad sólo se obtuvo entre 1µg/ml y 31,3ng/ml. Este aumento no permite cumplir con las metas propuestas pero, sin duda, este sistema se puede usar como una primera aproximación de la concentración de LPS en muestras problemáticas.

Como consecuencia de la sensibilidad limitada del ELISA desarrollado, recurrimos a la tinción de LPS con plata en los geles o transferencia a membrana de PVDF, la que tiene la capacidad de unir sitios hidrofóbicos de proteínas y otras moléculas. Al revelar la membrana por IWB es posible detectar el LPS (Figura 7) y, mediante el uso de un programa computacional (Gel-Pro Analyzer), se verificó la correlación entre la concentración de LPS y la densidad promedio de banda (Figura 8), obteniéndose en este caso linealidad entre 250µg/ml y 10µg/ml, como una primera aproximación. En un segundo ensayo se consiguió linealidad entre 2,4µg/ml y 37,5ng/ml (Figura 9). Este último valor corresponde a la sensibilidad obtenida, similar a la obtenida por ELISA (62,5ng/ml), pero este procedimiento tiene un costo económico inferior al ensayo inmunométrico y al LAL, y la visualización del LPS no es interferida por proteínas.

Para verificar que las inmunoglobulinas purificadas remueven LPS de *E. coli*, desde distintas soluciones, se montó una columna de extracción por inmovilización de anticuerpos.

con un volumen de 1ml. Las Inmunoglobulinas G, previamente purificadas desde suero policlonal anti-LPS, fueron conjugadas a Sefarosa activada con Bromuro de Cianógeno. La columna fue ensayada en diversos protocolos de extracción de LPS. La mayor eficiencia se obtuvo retroalimentando la columna cuatro veces con la fase móvil obtenida.

La cromatografía removió aproximadamente 2 μ g totales de LPS. Si consideramos el límite de sensibilidad de nuestro sistema de detección de endotoxina (37,5 ng/ml), podemos asegurar que la eficiencia de remoción fue de al menos un 96% (Figura 10, carril 1 *versus* 3). La columna fue adecuadamente regenerada tratándola con Buffer Glicina-Tritón (sección 4.3.1) y verificando la presencia de la endotoxina eluída mediante IWB (Figura 10, carril 7).

En vista de los resultados positivos obtenidos, se procedió a probar el comportamiento de la columna de inmunoafinidad en presencia de proteína (BSA 0,5 mg/ml y LPS 1 μ g/ml). En estas condiciones, la columna mostró una eficiencia de remoción inferior a la obtenida en ausencia de proteínas (Figura 11A, carril 4). Una parte del LPS no se retuvo en la columna, por saturación de ésta y/o por interacciones hidrofóbicas entre la endotoxina y el BSA. La proteína no mostró afinidad por la fase estacionaria (Figura 11B, carriles 6-8). La recuperación medible de la proteína fue cercana al 90%, incluso superior a lo descrito (Anspach & Hilbeck, 1995). En cuanto a la cantidad de LPS remanente en la solución proteica, ésta se cuantificó en una primera instancia por el método desarrollado en esta Memoria de Título (Figura 12) y posteriormente por ensayo LAL. La primera aproximación, usando IWB, para el frente, determinó una concentración de LPS <25 ng/ml (< 250 EU/ml). La determinación de

LPS en esta misma muestra, pero por método LAL, arrojó 25 y 17 ng/ml de LPS para el frente 1 y 2 (Figura 11, carril 3 y 4), que corresponde a 250 y 170 EU/ml. De este modo verificamos que el método desarrollado en esta Memoria de Título se aproxima bastante bien al método convencional, con algunas ventajas de costo.

Nuestro Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (LIAM) investiga los términos celulares y moleculares mediante los cuales la proteína chaperona calreticulina (TcCRT) participa en la relación *Trypanosoma cruzi* / hospedero mamífero. Se han descrito variadas funciones para CRT de mamíferos (Eggleton & Michalak, 2003), características compartidas por TcCRT (Ferreira y col, 2004). En estos trabajos se utiliza principalmente la versión recombinante de la proteína parasitaria (rTcCRT), generada en *E. coli*. Al ensayar la efectividad de remoción de LPS desde una solución de rTcCRT (Figura 13), ésta fue reconocida o interactuó no específicamente con las Inmunoglobulinas conjugadas a la fase estacionaria, desde la cual se eluyeron múltiples fragmentos de rTcCRT, incluida una banda de 19kDa (Figura 13A), muy probablemente derivada de la proteína recombinante, dada su sensibilidad a proteinasa K. La columna también removió una proporción menor de una proteína de 54kDa, posiblemente correspondiente a la proteína no degradada (Figura 13B). En esta cromatografía la pérdida de rTcCRT fue de un 45%. Una posible explicación para este hecho está fundamentada en las características de TcCRT, principalmente en su capacidad de chaperona (Michalak y col, 1999), lo que podría provocar que se adhieran a inmunoglobulinas de la columna, quedando retenidas en esta fase. También, se puede explicar por un fenómeno visto para algunas chaperonas las que son capaces de unir específicamente LPS (Reed y col, 2003), de este modo parte del LPS que se observa en las soluciones proteicas se explicaría por su unión a rTcCRT y

las proteínas que quedaron retenidas a la matriz se debería presumiblemente a su interacción con el LPS adsorbido o a la unión a las proteínas presentes en la matriz. Alternativa o concomitantemente, los anticuerpos anti-LPS reconocerían epitopos presentes en rTcCRT. Finalmente, se ha descrito que LPS, por ser electronegativo, establece puentes de Ca^{+2} con "calcium-binding proteins" (Petsch & Anspach, 2000).

La concentración de LPS remanente en la solución proteica recombinante fue $<25\text{ng/ml}$ ($<250\text{ EU/ml}$) (IWB, Figura 14, desarrollado en el contexto de esta Memoria de Título). La determinación de la concentración remanente por LAL señaló, sin embargo, que ésta alcanza a 35ng/ml (350EU/ml). Aparte de las variaciones experimentales esperables, en esta diferencia podría participar también la conversión de unidades, ya que mientras el método LAL determina concentraciones en EU/ml , el método de IWB lo hace en ng/ml , los que luego son convertidos a EU/ml , usando un valor estándar convencional de $1\text{EU/ml} = 100\text{pg/ml}$ de endotoxina. Por otra parte, como fue señalado en un principio, la actividad endotóxica del LPS varía de una cepa bacteriana a otra, y en este caso se ensayó una cepa distinta a la del estándar LAL. Cuando la proteína recombinante es recién purificada alcanza una concentración de hasta 2.500EU/mg de TcCRT. En este caso particular, la concentración de LPS previo al tratamiento era de 200ng/ml y disminuyó a 35ng/ml , por lo que se consigue una disminución cercana al 80% del LPS.

Dadas las diferentes eficiencias de remoción de endotoxina, dependientes de la proteína acompañante, es recomendable probar cada proteína, en un experimento analítico piloto. Los resultados presentados aquí señalan una medida de cautela para extrapolar el procedimiento inmunocromatográfico de remoción de endotoxina a otras proteínas.

Los anticuerpos anti-LPS de *E. coli*, generados en nuestro laboratorio, detectan también LPS de otras especies bacterianas Gram negativas (Figura 15), lo que amplía el potencial uso de la tecnología propuesta aquí.

Finalmente y en síntesis, en esta Memoria de Título, he propuesto la estandarización de un sistema cromatográfico de inmunoafinidad, para remover endotoxina desde soluciones proteicas, en particular recombinantes. Se obtuvo eficiencias de remoción cercanas al 90%, dependiendo de las propiedades de la proteína que acompaña al LPS. Obviamente, el método será de mayor utilidad cuanto mayor sea la actividad biológica de la proteína, pues permitirá trabajar con ella a altas diluciones, situación en que el LPS remanente post-cromatografía puede ser irrelevante e incluso estar en los niveles aceptables por la farmacopea internacional. Más aún, es probable que en soluciones de baja concentración de LPS se alcance niveles porcentuales de purificación superiores, dada la posibilidad que, a concentraciones altas, la columna se sature.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A. 2000. B cell activation and antibody production. *En Abbas A, Lichtman A, Pober J. Cellular and Molecular Immunology.* pp 191. WB Saunders Company.
- Aida, Y. & Pabst, M.J. 1990. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Methods* **132**: 191-195.
- Alexander, C., Rietschel, E.T. 2001. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Research* **7**(3): 167-202.
- Anspach, F.B. & Hilbeck, O. 1995. Removal of endotoxins by affinity sorbents. *J Chromatogr A* **711**: 81-92.
- Banchereau, J., Steinman, R.M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. **392**: 245-252.
- Bellingan, G. 1999. Inflammatory cell activation in sepsis. *Br Med Bull.* **55**: 12-29.
- Björck, L., Kronvall, G. 1987. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J. Immunol.* **133**: 969-974.
- Blatteis, C.M., Sehic, E. 1998. Cytokines and fever. *Ann NY Acad Sci.* **840**: 608-618.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254.
- Brandtzaeg, P., Kierulf, P., Gaustad, P., Skulberg, A., Bruun, J.N., Halvorsen, S. and Sorensen, E. 1989. Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. *J Infect Dis.* **159**: 195-204

Brigl, M., Brenner, M.B. 2004. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu. Rev. Immunol.* **22**: 817-890.

Casey, L.C., Balk, R.A., Bone, R.C. 1993. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med.* **119**: 771-778.

Coley, W.B. 1894. Treatment of inoperable malignant tumors with the toxins of Erysipelas and the *Bacillus prodigiosus*. *Am J Med Sci.* **108**: 183-212.

Coley-Nauts, H., Swift, W.E., Coley, B.L. 1946. The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, MD, revised in the light of modern research. *Cancer Res.* **6**: 205-216.

Cooper, N.R., Morrison, D.C. 1978. Binding and activation of the first component of human complement by the lipid A region of lipopolysaccharides. *J. Immunol.* **120**: 1862-1868.

Danner, R.L., Elin, R.J., Hosseini, J.M., Wesley, R.A., Reilly, J.M., Parillo, J.E. 1991. Endotoxemia in human septic shock. *Chest.* **99**: 169-175.

Damais, C., Jupin, C., Parant, M., Chedid, L. 1987. Induction of human interleukin-1 production by polymyxin B. *J Immunol Methods.* **101**: 51-56.

Dinarello, C.A. 1999. Immediate cytokine response to endotoxin: tumor necrosis factor-alpha and the interleukin-1 family. *En Brade H, Opal SM, Vogel SN, Morrison DC. (eds.) Endotoxin in Health and Disease.* pp 549-560. Marcel Dekker, New York.

Eggleton, P. & Michalak, M. 2003. Introduction to Calreticulin. *En P. Eggleton y M. Michalak (eds.), Calreticulin, second edition.* pp 1-6. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York.

Engval, E., Perlman, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin. *Immunochemistry*. **8**(9): 871-874.

Eskay, R.L., Grino, M., Chen, H.T. 1990. Interleukins, signal transduction, and the immune system-mediated stress response. *Adv Exp Med Biol*. **274**: 331-343.

European Pharmacopoeia, 1997. 3rd ed.

Ferreira, V., Molina M. C., Valck, C., Rojas, A., Aguilar, L., Ramirez, G., Schwaeble, W. y Ferreira, A. 2004. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate host. *Mol. Immunol*. **40**: 1279-1291.

Freudenberg, M.A., Galanos, C. 1978. Interaction of lipopolysaccharides and lipid A with complement in rats and its relation to endotoxicity. *Infect. Immun*. **19**: 875-882.

Galanos, C., Lüderitz, O., Rietschel, E.T. y col. 1985. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem*. **148**: 1-5.

Galanos, C., Rietschel, E.T., Lüderitz, O., Westphal, O. 1971. Interaction of lipopolysaccharides and lipid A with complement. *Eur. J. Biochem*. **19**: 143-152.

Goldbaum, F.A., Rubbi, C.P., Fossati, C.A. 1994. Removal of LPS from a *Brucella* cytoplasmic fraction by affinity chromatography with an anti-LPS monoclonal antibody as immunosorbent. *J Med Microbiol*. **40**: 174-178.

Green-Cross. 1986. Purification of urokinase and its precursor. Japanese patent, J. 61227782.

Hasday, J., Dubin, W., Fitzgerald, T., Bascom, R. 1996. Cigarettes are a rich source of bacterial endotoxin. *CHEST*. **109**: 63S-64S.

- Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M.G., Silber, R., Goyert, S.M. 1988. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J. Immunol.* **141**: 547-552.
- Hirayama, C., Sakata, M., Nakamura, M., Ihara, H., Kunitake, M., Todokoro, M. 1999. Preparation of poly(epsilon-lysine) adsorbents and application to selective removal of lipopolysaccharides. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **721**:187-195.
- Holst, O., Ulmer, A.J., Brade, H., Flad, H.D., Rietschel, E.T. 1996. Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **16**: 83-104.
- Karplus, T.E., Ulevitch, R.J., Wilson, C.B. 1987. A new method for reduction of endotoxin contamination from protein solutions. *J Immunol Methods* **105**: 211-220.
- Kitchens, R.L. 2000. Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. *Chem Immunol.* **74**: 61-82.
- Laemmli, E.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Legallais, C., Anspach, F.B., Bueno, S.M., Haupt, K., Vijayalakshmi, M.A. 1997. Strategies for the depyrogenation of contaminated immunoglobulin G solutions by histidine-immobilized hollow fiber membrane. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **691**: 33-41.
- Lesse, A., Campagnari, A., Bittner, W., Apicella, M. 1990. Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Immunol Methods.* **126**: 109-117
- Liu, S., Tobias, R., McClure, S., Styba, G., Shi, Q., Jackowski, G. 1997. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. *Clin Biochem.* **30**: 455-463.

Mazzola, P.G., Lam, H., Kavooosi, M., Haynes, C.A., Pessoa, A., Jr., Penna, T.C., Wang, D.I., Blankschtein, D. 2006. Affinity-tagged green fluorescent protein (GFP) extraction from a clarified *E. coli* cell lysate using a two-phase aqueous micellar system. *Biotechnol Bioeng.* **93**: 998-1004.

Medzhitov, R., Janeway, Jr. C.A. 2000. Innate immunity. *N Engl J Med.* **343**: 338-344

Michalak, M., Corbett, E.F., Mesaeli, N., Nakamura, K. and Opas, M. 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J.* **344** (Pt 2): 281-292.

Mitzner, S., Schneidewind, J., Falkenhagen, D., Loth, F., Klinkmann, H. 1993. Extracorporeal endotoxin removal by immobilized polyethylenimine. *Artif Organs.* **17**: 775-781.

Mold, C., Gewurz, H., Du Clos, T.W. 1999. Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology.* **42**: 23-30.

Morrison, D.C. & Leive, L. 1975. Fractions of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111:B4 prepared by two extraction procedures. *J Biol Chem* **250**: 2911-2919.

Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L.P., Allavena, P., Mantovani, A. 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol.* **164**: 5998-6004.

Muzio, M., Polentarutti, N., Bosisio, D., Prahladan, M.K., Mantovani, A. 2000b. Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* **67**: 450-456.

Neidhardt, E.A., Luther, M.A., Recny, M.A. 1992. Rapid, two-step purification process for the preparation of pyrogen-free murine immunoglobulin G1 monoclonal antibodies. *J Chromatogr.* **590**: 255-261.

Newton, B.A. 1956. The properties and mode of action of the polymyxins. *Bac Rev.* **20**: 14-27.

Opal, S.M., Scannon, P.J., Vincent, J.L., White, M., Carroll, S.F., Palardy, J.E., Parejo, N.A., Pribble, J.P., Lemke, J.H. 1999. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* **180**: 1584-1589.

Opal, S.M., Yu, Jr. R.L. 1998. Antiendotoxin strategies for the prevention and treatment of septic shock. New approaches and future directions. *Drugs.* **55**: 497-508.

Paredes, L. 1995. Inmunomodulación con anticuerpos policlonales anti-LPS de la reacción de Shwartzman y fenómenos asociados, en un modelo lapino. Memoria de Titulo (Médico Veterinario, Universidad de Chile)

Pearson, F.C., 1985. Pyrogens. Marcel Dekker, New York, pp. 119–220 (Chapters 9-11).

Petsch, D., Anspach, F.B. 2000. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol.* **76**: 97-119.

Pfeiffer, R. 1892. Untersuchungen über das Choeragift. *Z Hygiene.* **11**:393-412.

Reed, R., Berwin, B., Baker, J., Nicchitta, C. 2003. GRP94/gp96 Elicits ERK Activation in Murine Macrophages: a role for endotoxin contamination in nf- κ b activation and nitric oxide production. *J Biol Chem.* **278**: 31853-31860.

Rietschel, E., Brade, H., Holst, O., Brade, L., Muller-Loennies, S., Mamat, U., Zahringer, U., Beckmann, F., Seydel, U., Brandenburg, K., Ulmer, A., Mattern, T., Heine, H., Schletter, J., Loppnow, H., Schonbeck, U., Flad, H., Hauschildt, S., Schade, U., Di Padova, F., Kusumoto, S., Schumann, R. 1996. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol* **216**: 39-81.

Rietschel, E.T., Westphal, O. 1999. Endotoxin: Historical perspectives. En H. Brade, S.M. Opal, S.N. Vogel y D.C. Morrisson (eds.), Endotoxin in Health and Disease. pp 1-30. Marcel Dekker, New York.

Risberg, A., Masoud, H., Martin, A., Richards, J.C., Moxon, E.R., Schweda, E.K. 1999. Structural analysis of the lipopolysaccharide oligosaccharide epitopes expressed by a capsule-deficient strain of *Haemophilus influenzae* Rd. Eur J Biochem. **261**: 171-180.

Roberts, I.S. 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. **50**: 285-315.

Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., Kimoto, M. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. J Exp Med. **189**: 1777-1782.

Spector, T. (1978) Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. Anal Biochem. **86**: 142-146.

Starnes, C.O. 1992. Coley's toxins in perspective. Nature. **357**: 11-12.

Suffredini, A.F., Fantuzzi, G., Badolato, R., Oppenheim, J.J., O'Grady, N.P. 1999. New insights into the biology of the acute phase response. J Clin Immunol. **19**: 203-214.

Suffredini, A.F., O'Grady, N.P. 1999. Pathophysiological responses to endotoxin in humans. En Brade H, Opal SM, Vogel SN, Morrisson DC. (eds) Endotoxin in Health and Disease. pp 817-830. Marcel Dekker, New York.

Tsai, C.M. & Frasch, C.E. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. Anal Biochem. **119**: 115-119.

- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. **76**: 4350-4354.
- Vaara, M., Nikaido, H. 1984. Outer membrane organization. En E.T. Rietschel (ed.), Handbook of Endotoxin, vol. 1 pp 1-45. Elsevier, Amsterdam.
- Vukajlovich, S.W.. 1986. Antibody-independent activation of the classical pathway of human serum complement by lipid A is restricted to Rechemotype lipopolysaccharide and purified lipid A. Infect. Immun. **53**: 480-485.
- Wada, H., Wakita, Y., Shiku, H. 1995. Tissue factor expression in endothelial cells in health and disease. Blood Coagul Fibrinolysis. **6 (1)**: S26-S31.
- Westphal, O., Lüderitz, O., Bister, F. 1952. Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z Naturforsch. **B7**: 148-155.
- Westphal, O., Lüderitz, O. 1954. Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden Gram-negativer Bakterien. Angew Chemie. **66**: 407-417.
- Wiemann, B., Starnes, C.O. 1994. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. Pharmacol Ther. **64**: 529-564.
- Woltmann, A., Hamann, L., Ulmer, A.J., Gerdes, J., Bruch, H.P., Rietschel, E.T. 1998. Molecular mechanisms of sepsis. Langenbecks Arch Surg. **383**: 2-10.
- Wyckoff, T.J., Raetz, C.R., Jackman, J.E. 1998. Antibacterial and antiinflammatory agents that target endotoxin. Trends Microbiol. **6**: 154-159.
- Yamasaki, R., Kerwood, D.E., Schneider, H., Quinn, K.P., Griffiss, J.M., Mandrell, R.E. 1994. The structure of lipooligosaccharide produced by *Neisseria gonorrhoeae*, strain 15253, isolated from a patient with disseminated infection. Evidence for a new

glycosylation pathway of the gonococcal lipooligosaccharide. *J Biol Chem.* **269**: 30345-30351.

Zeisberger, E., Roth, J. 1993. Neurobiological concepts of fever generation and suppression. *Neuropsychobiology.* **28**: 106-109.