



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de Doctor en Química.

Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en el campo de la Química.

**“OBTENCIÓN DE UN REACTIVO DE
INMUNOAGLUTINACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA
INFECCIÓN POR *TRYPANOSOMA CRUZI*”**

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC),
dependiente de la Universidad Nacional del Litoral (UNL) y del Consejo Nacional
de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Lic. Valeria Soledad Garcia

Director de Tesis: Dr. Gugliotta, Luis M.

Codirector de Tesis: Dra. Gonzalez, Verónica D. G.

Miembros del Jurado: Dra. Strumia, Miriam C.

Dra. Giacomelli, Carla E.

Dr. Amalvy, Javier I.

- Año 2011 -

DEDICATORIA

Me gustaría dedicar esta Tesis a toda mi familia.

A mis padres Inés y Neno, por su comprensión y ayuda en los buenos momentos y no tan buenos. Me han enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio.

A mis hermanos, Toy y Pitu y a mis cuñas Diegui y Negrita que con sus locuras me hacían bajar un cambio. Por creer y confiar siempre en mi, y por apoyarme en todas las decisiones que he tomado en la vida.

A la “princesita” que la veo crecer a la distancia...

A “el Turco”, a él especialmente le dedico esta Tesis. Por su paciencia, por su compañía, por su comprensión, por su empeño, por su fuerza, por su amor, por ser tal y como es, por crecer y progresar juntos... porque lo amo. Realmente el me llena por dentro para conseguir un equilibrio que me permita dar el máximo de mi.

A mis hijos, Tomás y Facundo, por ser el sentido de mi vida y la fuente de mi inspiración y motivación para superarme cada día. Ellos son lo mejor que me ha pasado.

A todos ellos, muchas gracias de todo corazón.

***Somos una infinidad de sueños ya cumplidos
y una infinidad de sueños por cumplir.***

*Que hoy tengas paz interior.
Que confíes que el Señor te tiene exactamente donde debes estar.
Que no olvides las posibilidades infinitas que nacen de la fe.
Que utilices las gracias que haz recibido y que pases a los
demás ese amor que te ha sido dado.
Que para ti sea suficiente saberte hijo de Dios.
Permite que su presencia se aloje en tus huesos y
de libertad a tu alma para cantar, bailar, alabar y amar
Él está ahí para cada uno de ustedes.*

Santa Teresita

1873 - 1897

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han colaborado en la realización de este trabajo, y en especial a:

A los Dres. Luis Gugliotta, y Jorge Vega por su permanente estímulo y apoyo. Ellos, a su manera, han sido capaces de ganarse mi lealtad y admiración, por todo lo recibido durante el periodo de tiempo que ha durado esta Tesis Doctoral.

A la Dra. Verónica Gonzalez, sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación.

Al INTEBIO, Instituto de Tecnología Biológica (FBCB-UNL), y en especial al Dr. Iván Marcipar, por su enseñanza y colaboración.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por la ayuda económica brindada.

RESUMEN

Actualmente, la Enfermedad de Chagas es reconocida como la principal endemia de América Latina, afectando a aproximadamente 18 millones de personas en todo el continente Sudamericano, y a 2 millones y medio en la Argentina (OMS, 2010). Aunque el agente causal, el parásito *Trypanosoma cruzi*, fue descubierto por Carlos Chagas en 1909, la extensión de la enfermedad, su importancia epidemiológica y por lo tanto su dimensión como problema social recién fue comprobada a mediados del siglo XX, momento a partir del cual comienza una serie de acciones destinadas a combatirla. En este proceso, fue central el papel del diagnóstico de la enfermedad.

El diagnóstico serológico, basado en la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en el suero del paciente, tiene su origen en Argentina en 1913, cuando fue descrita la prueba de Fijación del Complemento por los Dres. Guerreiro y Machado. Sin embargo, la falta de procedimientos estandarizados dio lugar a resultados no comparables entre los diferentes laboratorios que realizaban el diagnóstico de esta enfermedad. Recién en 1983 el Programa TDR (Tropical Disease Research) de la OMS inicia un proceso para lograr la estandarización del mismo en el continente americano. Desde entonces, el avance del diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas ha sido enorme. Sin embargo, el diagnóstico serológico no es de certeza, sino probabilístico y, por tanto, requiere de adecuados controles para la obtención de datos confiables.

Para cada situación en que se aplicará el diagnóstico serológico, se deben seleccionar las pruebas más idóneas para ese propósito, considerando su sensibilidad, especificidad, facilidad operativa, y posibilidad de automatización.

En la actualidad, los látex poliméricos son objeto de un interés creciente por sus aplicaciones en “tests de aglutinación”, que permiten detectar pequeñas concentraciones de antígenos o anticuerpos en diferentes fluidos biológicos como la orina, el suero sanguíneo y el fluido cerebroespinal.

Los “tests de aglutinación” son pruebas no convencionales conocidas también como “pruebas rápidas” de muy fácil ejecución e interpretación, que no requieren de equipos sofisticados y pueden hacerse en campo. Su empleo, permitiría la identificación rápida de focos de transmisión, y podría utilizarse como test de pretamizaje en áreas de alta prevalencia.

Esta Tesis trata la producción de partículas de látex sensibilizadas con proteínas antigénicas del *T. cruzi*, de manera que puedan actuar como reactivo de inmunodiagnóstico para detectar la Enfermedad de Chagas.

Para ello, se sintetizaron partículas del tipo “core-shell” mediante copolimerización en emulsión de estireno (St) y ácido metacrílico (AMA); y de St y acroleína dietil acetal (ADEA) sobre una siembra monodispersa de poliestireno (PS); y se caracterizaron a partir de la determinación del tamaño de partículas, la concentración crítica de coagulación, y la densidad de carga superficial.

Se sintetizaron además, distintas proteínas antigénicas del *T. cruzi* a partir de la tecnología del ADN recombinante, y se las utilizó para llevar a cabo la sensibilización de las partículas de látex. En primer lugar, se estudió la adsorción física de las distintas

proteínas a diferentes pH sobre partículas de PS. Posteriormente, mediante la activación de los grupos carboxilo con carbodiimida, y la transformación de los grupos acetal en aldehído, se logró la unión covalente de las proteínas sobre la superficie de las partículas funcionalizadas.

Finalmente, se aplicaron los distintos complejos látex-proteína en ensayos de inmunoaglutinación. En una primera instancia se utilizaron sueros controles para determinar las condiciones óptimas de reacción, es decir, aquellas que permitan la mayor diferenciación entre un suero positivo y un suero negativo. Posteriormente, los complejos se enfrentaron a un panel de sueros con el objeto de analizar la sensibilidad y especificidad del ensayo. La reacción de inmunoaglutinación se siguió por el método visual y por turbidimetría, es decir, midiendo los cambios de absorbancia que ocurren al entrar en contacto el complejo látex-proteína con el suero del paciente.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN.....	ix
ÍNDICE GENERAL.....	xiii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xxiii
PRÓLOGO.....	xxxiii
CAPÍTULO 1: Consideraciones Generales	
1.1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. SINTESIS DE LATEX FUNCIONALIZADOS.....	3
1.2.1. Producción de Partículas por Polimerización en Emulsión.....	3
1.2.2. Síntesis de Partículas Funcionalizadas.....	9
1.3. LIMPIEZA Y CARACTERIZACION DE LOS LATEX.....	13
1.3.1. Métodos de limpieza.....	13
1.3.2. Caracterización Morfológica y Superficial.....	16
1.3.2.1. Caracterización de Tamaños de Partícula.....	17
1.3.2.2. Caracterización Superficial de las Partículas.....	23
1.4. SINTESIS DE LAS PROTEINAS UTILIZADAS.....	27
1.4.1. Generalidades de la Enfermedad de Chagas.....	29
1.4.1.1. Diagnóstico.....	30
1.4.2. Tecnología del ADN Recombinante.....	32

1.4.2.1.	Ventajas del uso de Proteínas Recombinantes.....	36
1.5.	SENSIBILIZACIÓN DE LAS PARTICULAS DE LATEX.....	38
1.5.1.	Estructura de las proteínas.....	39
1.5.2.	Métodos colorimétricos utilizados para la cuantificación de proteínas.....	42
1.5.2.1.	Método de Biuret.....	42
1.5.2.2.	Método de Bradford.....	43
1.5.2.3.	Método del Acido Bicinconínico (BCA).....	44
1.5.3.	Interacción látex-proteína.....	45
1.6.	APLICACIÓN DE LOS COMPLEJOS LATEX-PROTEINA EN ENSAYOS DE INMUNOAGLUTINACION.....	49
1.6.1.	Métodos de Inmunodiagnóstico Utilizados de Referencia.....	53
1.6.2.	Evaluación de la Sensibilidad y Especificidad de un Inmunoensayo.....	58

CAPÍTULO 2: Síntesis Controlada, Limpieza y Caracterización de Látex Funcionalizados

2.1.	INTRODUCCION.....	63
2.2.	TRABAJO EXPERIMENTAL.....	67
2.2.1.	Reacciones de Polimerización.....	67
2.2.1.1.	Materiales y Métodos.....	67
2.2.1.2.	Látex de Poliestireno.....	69
2.2.1.3.	Látex con Funcionalidad Carboxilo.....	70
2.2.1.4.	Látex con Funcionalidad Acetal.....	72
2.2.2.	Limpieza de los Látex.....	73
2.2.3.	Caracterización de Tamaños de Partículas.....	74
2.2.3.1.	Determinación de los Diámetros Medios.....	74
2.2.4.	Caracterización Superficial.....	78
2.2.4.1.	Cuantificación de los grupos sulfato.....	79

2.2.4.2.	Cuantificación de los Grupos Carboxilos.....	80
2.2.4.3.	Cuantificación de los Grupos Acetal.....	81
2.2.5.	Estabilidad coloidal.....	83
2.3.	CONCLUSIONES.....	86

CAPÍTULO 3: Síntesis de las Proteínas Utilizadas

3.1.	INTRODUCCION.....	89
3.2.	TRABAJO EXPERIMENTAL.....	93
3.2.1.	Materiales.....	93
3.2.1.1.	Soluciones.....	93
3.2.1.2.	Medios de cultivo.....	94
3.2.2.	Obtención del Homogenato del <i>T. cruzi</i>	95
3.2.3.	Obtención de las Proteínas Recombinantes.....	95
3.2.4.	Expresión de las Proteínas Recombinantes.....	96
3.2.5.	Purificación de las Proteínas Recombinantes.....	97
3.2.6.	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	99
3.2.7.	Cuantificación de las Proteínas.....	101
3.2.8.	Evaluación de la Antigenicidad de las Proteínas Recombinantes.....	103
3.2.9.	Caracterización de las Proteínas Utilizadas.....	104
3.2.10.	CONCLUSIONES.....	107

CAPITULO 4: Sensibilización de las Partículas con Proteínas Antigénicas del *T. cruzi*.

4.1.	INTRODUCCION.....	109
4.2.	TRABAJO EXPERIMENTAL.....	111
4.2.1.	Adsorción Física.....	111
4.2.2.	Unión Covalente sobre Partículas con Funcionalidad Carboxilo.....	118

4.2.3.	Unión Covalente sobre Partículas con Funcionalidad Acetal.....	128
4.4.	Caracterización de los Complejos Látex-Proteína.....	135
4.4.1.	Determinación de la Concentración Crítica de Coagulación (<i>c.c.c.</i>) de los complejos látex-proteína.....	135
4.4.2.	Análisis de los Complejos Látex-Proteína mediante MDLS.....	136
4.4.3.	Análisis de los Complejos Látex-Proteína por Turbidimetría.....	137
4.5.	CONCLUSIONES.....	138

CAPITULO 5: Aplicación de los Distintos Complejos Látex-Proteína en Ensayos de Inmunoaglutinación

5.1.	INTRODUCCION.....	143
5.2.	TRABAJO EXPERIMENTAL.....	147
5.2.1	Aplicación de los Látex con Funcionalidad Carboxilo.....	148
5.2.1.1.	Estudio de la Influencia de las Condiciones de Reacción Utilizando Sueros Control.....	148
5.2.1.1.a.	Influencia del Tiempo de Reacción.....	148
5.2.1.1.b.	Influencia de la Fuerza Iónica del Medio y de la Presencia de Aditivos.....	151
5.2.1.1.c.	Influencia de la Concentración de Látex y de la Presencia de PEG.....	153
5.2.1.2.	Comparación de los Diferentes Complejos Látex-proteína Bajo Distintas Condiciones Utilizando Sueros Control.....	155
5.2.1.2.a.	Efecto de la Fuerza Iónica del Medio.....	155
5.2.1.2.b.	Efecto de la Cantidad de Proteína Unida.....	156
5.2.1.2.c.	Efecto del Mecanismo de Sensibilización.....	158
5.2.1.3.	Detección de la Reacción de Inmunoaglutinación mediante el Método Visual.....	159

5.2.1.4.	Evaluación de la Sensibilidad y Especificidad del Ensayo con Detección Turbidimétrica de la Inmunoaglutinación.....	161
5.2.1.4.a.	Evaluación de los Complejos Obtenidos con el Homogenato del <i>T. cruzi</i> y con las Proteínas Recombinantes Simples.....	161
5.2.1.4.b.	Evaluación de los Complejos Obtenidos con una Proteína Recombinante Simple y con una Proteína Recombinante Quimérica Expresadas en el Mismo Vector.....	163
5.2.1.4.c.	Evaluación de los Complejos Obtenidos con Proteínas Recombinantes Quiméricas Expresadas en Distintos Vectores.....	164
5.2.1.5.	Estudio de la Estabilidad de los Complejos Látex-Proteína en el Tiempo.....	168
5.2.2.	Aplicación de los Látex con Funcionalidad Acetal.....	170
5.2.2.1.	Resultados del Inmunoensayo con Sueros Control en Función de la Cantidad de Proteína Unida y de la Cantidad de Grupos Funcionales Superficiales.....	170
5.2.2.3.	Estudio de la Estabilidad en el Tiempo.....	172
5.2.2.2.	Evaluación de Sensibilidad y Especificidad del Ensayo.....	174
5.4.	CONCLUSIONES.....	176

CAPÍTULO 6: Conclusiones y Sugerencias para Trabajos Futuros

6.1.	INTRODUCCIÓN.....	181
6.1.1.	Obtención de los Látex Funcionalizados.....	182
6.1.2.	Caracterización de las Partículas Coloidales.....	183
6.1.3.	Expresión y Purificación de las Proteínas Antigénicas del <i>Trypanosoma cruzi</i>	183
6.1.4.	Preparación de los Complejos Látex-Proteína.....	184
6.1.5.	Aplicación de los Complejos Látex-Proteína en Ensayos de Inmunoaglutinación.....	185

ABREVIATURAS.....	187
NOMENCLATURA.....	191
REFERENCIAS.....	195

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1.1. Principales métodos colorimétricos para la cuantificación de proteínas.	45
2.1. Recetas, condiciones de reacción y características del látex de PS.....	70
2.2. Receta, condiciones y características del látex obtenido en la copolimerización “semibatch” de estireno y ácido metacrílico.....	71
2.3. Recetas, condiciones y características del látex obtenido en la copolimerización “batch” de estireno y acroleína dietil acetal.....	72
2.4. Diámetro medio de partículas obtenidos por SEM, DLS y T.....	76
2.5. Densidad de carga superficial y densidad de grupos funcionales obtenidas mediante valoraciones conductimétricas de los látex estudiados.....	83
2.6. Valores de la <i>c.c.c.</i> determinados visualmente y por DLS a 90° (a 2 pH diferentes) para los cuatro látex sintetizados.....	84
2.7. Principales características de los látex a utilizar en la etapa de sensibilización con proteínas.....	86
3.1. Concentraciones de las proteínas recombinantes (mg/ml) obtenidas en distintos procesos de purificación.....	103
3.2. Características de las distintas proteínas recombinantes del <i>T. cruzi</i> utilizadas.....	106

4.1. Adsorción física del Homogenato del <i>T. cruzi</i> sobre partículas de PS. Recetas y densidades superficiales (Γ_{Hom}).....	114
4.2. Adsorción física de la proteína recombinante Ag36 sobre partículas de PS. Recetas y densidades superficiales (Γ_{Ag36}).....	115
4.3. Adsorción física de la proteína recombinante simple FRA sobre partículas de PS. Recetas y densidades superficiales (Γ_{FRA}).....	116
4.4. Adsorción física de la proteína CP1 expresada en pET24a sobre partículas de PS. Recetas y densidades superficiales (Γ_{CP1}).....	116
4.5. Unión covalente del Homogenato del <i>T. cruzi</i> sobre partículas carboxiladas. Recetas, densidades superficiales (Γ_{Hom}) y fracciones unidas covalentemente.....	120
4.6. Unión covalente de Ag36 sobre partículas carboxiladas. Recetas, densidades superficiales (Γ_{Ag36}) y fracciones unidas covalentemente.....	121
4.7. Unión covalente de FRA sobre partículas carboxiladas. Recetas, densidades superficiales (Γ_{FRA}) y fracciones unidas covalentemente.....	122
4.8. Unión covalente de CP1 expresada en pET32a sobre partículas carboxiladas. Recetas, densidades superficiales (Γ_{CP1}) y fracciones unidas covalentemente.....	123
4.9. Unión covalente de CP1 expresada en pET24a sobre partículas carboxiladas. Recetas, densidades superficiales (Γ_{CP1}) y fracciones unidas covalentemente.....	124
4.10. Relación entre la cantidad de grupos carboxilo superficiales y la cantidad de proteína unida a medida que aumenta la $C^{\circ}_{\text{Prot.}}(\text{mg/ml})$	128
4.11. Unión covalente de FRA sobre las partículas con funcionalidad acetal A1. Recetas, densidades superficiales (Γ_{FRA}) y fracciones unidas covalentemente.....	131

4.12. Unión covalente de FRA sobre las partículas con funcionalidad acetal A2. Recetas, densidades superficiales (Γ_{FRA}) y fracciones unidas covalentemente.....	131
4.13. Unión covalente de CP1 sobre las partículas con funcionalidad acetal A1. Recetas, densidades superficiales (Γ_{CP1}) y fracciones unidas covalentemente.....	132
4.14. Unión covalente de CP1 sobre las partículas con funcionalidad acetal A2. Recetas, densidades superficiales (Γ_{CP1}) y fracciones unidas covalentemente.....	132
4.15. Relación entre la cantidad de grupos acetal y la cantidad de proteína unida en función de $C^{\circ}_{\text{Prot.}}$ (mg/ml).....	134
4.16. Valores de <i>c.c.c.</i> a pH 8 obtenidos por DLS a 90° para los distintos complejos.....	136
5.1. Relación $\Delta A (+)/\Delta A (-)$ en función de la cantidad de proteína unida covalentemente para los complejos formados con el látex R2.....	158
5.2. Valores de cut-off y de eficiencia y límite de discriminación para distintos complejos látex-proteína.....	167
5.3. Reactividad en el tiempo de los complejos R2-FRA y R2-CP1. Evolución de la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ desde la sensibilización.....	169
5.4. Relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ en función de la cantidad de proteína unida covalentemente para los complejos formados con el látex A1 ($3,21 \times 10^{-8}$ mEq/cm ²).....	171
5.5. Relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ en función de la cantidad de proteína unida covalentemente para los complejos formados con el látex A2 ($6,28 \times 10^{-8}$ mEq/cm ²).....	171
5.6. Reactividad en el tiempo de los complejos con funcionalidad acetal. Evolución de la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ desde la sensibilización.....	174

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1.1. Proceso de polimerización en emulsión.....	7
1.2. Procesos de producción de tipo: a) discontinuo; b) semicontinuo; c) continuo.....	8
1.3. Morfología de las partículas de látex.....	9
1.4. Representación esquemática del equipo de diálisis. Condición: a) al comienzo y b) al final del proceso.....	14
1.5. Representación esquemática del equipo de desplazamiento de suero. Condición: a) al comienzo y b) al final del proceso	16
1.6. Representación esquemática y fotografía del equipo de DLS utilizado.....	18
1.7. Representación esquemática y fotografía del espectrofotómetro utilizado.....	21
1.8. Diagrama de conductividad de un ácido fuerte y de un ácido débil frente a un volumen de solución valorante de NaOH.....	24
1.9. Ciclo de vida del <i>T. cruzi</i> en el triatomino y en el hombre.....	30
1.10. Pasos en la tecnología del ADN recombinante.....	36
1.11. Estructura general de un aminoácido.....	40
1.12. Estructuras de una proteína.....	41

1.13.	Reacción que tiene lugar durante la cuantificación de proteínas mediante el Método de Buiet.....	43
1.14.	Reacción que tiene lugar durante la cuantificación de proteínas mediante el Método de Bradford.....	44
1.15.	Reacción que tiene lugar durante la cuantificación de proteínas mediante el Método de BCA.....	45
1.16.	Esquema de activación de un látex carboxilado con EDC y posterior reacción con una molécula de proteína.....	48
1.17.	Estructura del anticuerpo y puntos funcionales.....	50
1.18.	Esquema de interacción con un suero policlonal de un antígeno: a) multiepítope, b) simple.....	51
1.19.	Curva de aglutinación cuantitativa durante la interacción Ag-Ac.....	57
1.20.	Representación esquemática de la curva ROC en dos situaciones extremas.....	61
2.1.	Esquema y foto del equipo experimental utilizado para las polimerizaciones.....	68
2.2.	Evolución de la conversión (a) y del diámetro medio de partícula medido por DLS a 90° (b) del látex de PS S4 sintetizado mediante polimerización en emulsión.....	70
2.3.	Evolución de la conversión (a) y de los tamaños medios de partícula medidos por DLS a 90° (b) del látex R2.....	71
2.4.	Evolución de la conversión y de los tamaños medios de partícula medidos por DLS a 90° de los látex con funcionalidad acetal A1 (a; b) y A2 (c; d).....	73
2.5.	Micrografías SEM de los látex sintetizados: a) látex de PS S4 con morfología homogénea; b) látex con funcionalidad carboxilo, R2, con morfología “core-shell”; c y d) látex con funcionalidad acetal, A1 y A2, con morfología “core-shell”	75

2.6.	Diámetros promedio de DLS en función del ángulo de detección. a) látex de PS S4; b) látex carboxilado R2.....	77
2.7.	Valoración conductimétrica de una solución de biftalato de potasio con la solución valorante de NaOH.....	78
2.8.	Valoración conductimétrica del látex de PS S4 para la determinación de grupos sulfato superficiales.....	79
2.9.	Valoración conductimétrica del látex tipo “core-shell” R2 para la determinación de los grupos sulfato y carboxilo superficiales.....	80
2.10.	Esquema de las reacciones involucradas en la valoración de los grupos funcionales acetal.....	81
2.11.	Valoración conductimétrica de la disolución de clorhidrato del hidroxilamina con NaOH.....	82
2.12.	Valoración conductimétrica del látex tipo núcleo-coraza A1, para la determinación de los grupos acetal superficiales.....	83
2.13.	Determinación de la <i>c.c.c.</i> a pH 8 por DLS a 90°. a) látex A1; b) látex A2.....	84
3.1.	Vectores utilizados para la clonación de las proteínas recombinantes.....	96
3.2.	Imagen del gel de SDS-poliacrilamida de clones de <i>E. coli</i> transformados con el plásmido FRA-pET-32a. En la primera calle se muestra la expresión basal de las proteínas de la bacteria, sin IPTG; en la segunda calle se muestra la expresión de la proteína FRA, como resultado del agregado de IPTG.....	97
3.3.	Proceso de purificación de las proteínas recombinantes en columnas de pseudoafinidad a Niquel.....	98
3.4.	Electroforesis en gel de poliácridamida en condiciones desnaturizantes. (SDS-PAGE).....	100
3.5.	SDS-PAGE obtenido al sembrar las distintas fracciones recolectadas en la purificación de la proteína FRA junto con la curva de calibrado de la BSA.....	102

3.6. Curva de calibrado de BSA y cuantificación de las fracciones eluidas con Imidazol 100 y 250 mM obtenidas en el proceso de purificación de la proteína CP1.....	102
3.7. Procedimiento para determinar la actividad biológica de las proteínas recombinantes mediante ELISA.....	103
4.1. Representación esquemática del proceso de sensibilización mediante adsorción física.....	112
4.2. Experimentos A-D de adsorción física del Homogenato del <i>T. cruzi</i> sobre partículas de PS. La masa de proteína adsorbida por unidad de área superficial, Γ_{Hom} , se representa en función de la concentración de proteína no adsorbida en solución en el equilibrio, $C_{Hom, sol}$	114
4.3. Experimentos K-N de adsorción física de la proteína CP1 sobre partículas de PS. La masa de proteína adsorbida por unidad de área superficial, Γ_{CP1} , se representa en función de la concentración de proteína no adsorbida en solución en el equilibrio, $C_{CP1, sol}$	117
4.4. Esquema del mecanismo involucrado en la unión covalente de la proteína con los grupos funcionales superficiales de las partículas carboxiladas.....	119
4.5. Unión covalente del Homogenato del <i>T. cruzi</i> sobre las partículas carboxiladas. a) pH 5; b) pH 7. Proteína unida total (barra verde oscuro) y proteína unida covalentemente (barra verde claro) en función de la concentración de proteína inicial, C°_{Hom} . El porcentaje sobre la barra verde claro indica la fracción de proteína unida covalentemente.....	120
4.6. Unión covalente de Ag36 sobre las partículas carboxiladas. a) pH 5; b) pH 7. Proteína unida total (barra verde oscuro) y proteína unida covalentemente (barra verde claro) en función de la concentración de proteína inicial, C°_{Ag36} mg/ml. El porcentaje sobre la barra verde claro indica la fracción de proteína unida covalentemente.....	121

4.7. Unión covalente de FRA sobre las partículas carboxiladas. a) pH 5; b) pH 7. Proteína unida total (barra verde oscuro) y proteína unida covalentemente (barra verde claro) en función de la concentración de proteína inicial, C°_{FRA} . El porcentaje sobre la barra verde claro indica la fracción de proteína unida covalentemente.....	122
4.8. Unión covalente de CP1 expresada en pET32a sobre las partículas carboxiladas a pH 5. Proteína unida total (barra verde oscuro) y proteína unida covalentemente (barra verde claro) en función de la concentración de proteína inicial, C°_{CP1} . El porcentaje sobre la barra verde claro indica la fracción de proteína unida covalentemente.....	123
4.9. Unión covalente de CP1 expresada en pET24a sobre las partículas carboxiladas a pH 5 y pH 7. Proteína unida total (barra verde oscuro) y proteína unida covalentemente (barra verde claro) en función de la concentración de proteína inicial, C°_{CP1} . El porcentaje sobre la barra verde claro indica la fracción de proteína unida covalentemente.....	124
4.10. Relación entre la proteína unida covalentemente y la proteína adicionada para las distintas proteínas recombinantes a pH 5 (a) y pH 7 (b). $C_i = 0,3$ (•); $C_i = 0,6$ (◻); $C_i = 0,9$ (◻); $C_i = 1,2$ (◻) mg/ml.....	127
4.11. Esquema del mecanismo involucrado en la unión covalente de las proteínas antigénicas con los grupos funcionales superficiales de partículas de látex acetal.....	129
4.12. Unión covalente de FRA sobre las partículas con funcionalidad acetal a pH 5. a) complejo A1-FRA; b) complejo A2-FRA. Proteína unida total (barra verde oscuro) y proteína unida covalentemente (barra verde claro) en función de la concentración de proteína inicial. El porcentaje sobre la barra verde claro indica la fracción de proteína unida covalentemente.....	133
4.13. Unión covalente de CP1 sobre las partículas A1 y A2 a pH 5. Proteína unida total (barra verde oscuro) y proteína unida covalentemente (barra verde claro) en función de la concentración de proteína inicial. El porcentaje sobre la barra verde claro indica la fracción de proteína unida covalentemente.....	133

4.14. Esquema del mecanismo fisicoquímico involucrado en la unión covalente de la proteína con los grupos funcionales superficiales de partículas con funcionalidad acetal, en presencia del agente reductor BH_4Na	135
4.15. Determinación de la <i>c.c.c</i> por DLS a 90° . Diámetro de partícula del complejo A1-FRA por DLS a 90° frente a la concentración de KBr.....	136
4.16. Diámetros promedio de DLS en función del ángulo de detección para el látex R2 (●) y para los complejos R2-CP1 (pET24a) (▼) y R2-CP1 (pET32a) (○).....	137
4.17. Espectro de Absorbancia en función de la longitud de onda para el látex R2 sin sensibilizar y de los complejos R2-CP1 (pET32a) a distintas concentraciones de proteína unida covalentemente. (Δ) R2; (●) 1,65 mg/ml; (○) 2,46 mg/ml; (▼) 2,64 mg/ml.....	138
5.1. Proceso de inmunoaglutinación.....	145
5.2. Influencia del tiempo de reacción durante el ensayo de IA, utilizando los sueros controles. Evolución de la absorbancia del complejo R2-FRA (4,53 mg/m ²) en ausencia del suero (---) y después de mezclarlo con suero positivo (---) o suero negativo (---).....	149
5.3. Influencia del tiempo de reacción durante el ensayo de IA utilizando los sueros controles y el complejo R2-FRA. Evolución de la relación $\Delta A (+)/\Delta A (-)$ para concentraciones crecientes de proteína unida covalentemente 2,97 mg/m ² (---); 3,77 mg/m ² (---) y 4,53 mg/m ² (---).....	149
5.4. Influencia del tiempo de reacción durante el ensayo de IA utilizando los sueros controles. Respuesta obtenida con el complejo R2-FRA (4,53 mg/m ²) a tiempos de reacción mayores a los 5 minutos. La barra verde oscuro representa la respuesta con el suero positivo y la verde clara la respuesta con el suero negativo.....	150

5.5.	Variación de la absorbancia por adición de diferentes concentraciones de suero positivo (símbolo lleno) o suero negativo (símbolo vacío), después de 5 minutos de reacción para el complejo R2-CP1 en presencia de Tween-20 (■); Glicina (▲); Tween-20 y Glicina (◆) y en ausencia de aditivos (●). a) baja fuerza iónica (10 mM); b) alta fuerza iónica (150 mM).....	153
5.6.	Variación de la absorbancia por adición de diferentes concentraciones de suero positivo (símbolo lleno) o suero negativo (símbolo vacío) a baja fuerza iónica (10 mM) y después de 5 minutos de reacción para el complejo R2-Ag36 (▲); S4-Homogenato del <i>T. cruzi</i> (◆) y R2-CP1 (●). a) en presencia de Glicina); b) en presencia de Tween-20.....	153
5.7.	Efecto de la concentración de partículas y de la presencia de PEG en el buffer de reacción, en los ensayos de IA con el complejo R2-CP1. a) con PEG; b) sin PEG. La barra verde oscuro representa al suero positivo y la verde clara al suero negativo.....	154
5.8.	Influencia de la fuerza iónica del medio de reacción durante el ensayo de IA utilizando los sueros control y distintos complejos látex-proteína basados en el látex carboxilado R2. a) Homogenato del <i>T. cruzi</i> (0,95 mg/m ²) b) Ag36 (3,98 mg/m ²); c) FRA (4,53 mg/m ²) d) CP1 (3,9 mg/m ²). La barra verde oscuro representa al suero positivo y la verde clara al suero negativo.....	156
5.9.	Influencia de la concentración de proteína antigénica unida sobre el ensayo de IA. a) complejo R2-FRA; b) complejo R2-CP1. La barra verde oscuro representa al suero positivo y la verde claro al suero negativo.....	157
5.10.	Influencia del tipo de unión látex-proteína sobre el ensayo de IA. a) Homogenato del <i>T. cruzi</i> ; b) Ag36; c) CP1. La barra verde oscuro representa al suero positivo y la verde claro al suero negativo.....	159
5.11.	Ensayo de IA detectado utilizando el Método Visual a los 4 minutos de poner en contacto al suero control positivo (primera fila) y al suero control negativo (segunda fila) a distintas concentraciones de proteína unida utilizando el complejo R2-CP1 (pET24a). a) 2,90 mg/m ² ; b) 1,57 mg/m ² ; c) 4,93 mg/m ²	160

5.12. Curvas ROC obtenidas al enfrentar un panel de 30 sueros a distintos complejos látex-proteína a) complejo R2- Homogenato del <i>T. cruzi</i> ; b) complejo R2-Ag36; c) complejo R2-FRA.....	162
5.13. Distribuciones de ΔA relativas para un panel de 15 sueros positivos y 15 sueros negativos obtenidas utilizando los complejos R2-Homogentao del <i>T. cruzi</i> ; R2-Ag36 y R2-FRA. Los segmentos horizontales continuos muestran los valores medios en cada ensayo, mientras que la línea horizontal punteada indica el valor de corte para discriminar entre sueros positivos y sueros negativos.....	163
5.14. Curvas ROC obtenidas al enfrentar un panel de 50 sueros a distintos complejos látex-proteína a) R2-FRA (pET32a); b) R2-CP1 (pET32a).....	164
5.15. Distribución de la ΔA relativa para un panel de 25 sueros positivos y 25 sueros negativos utilizando los complejos R2-FRA y R2-CP1 ambos expresados en el vector pET32a. Los segmentos horizontales continuos muestran los valores medios en cada ensayo, mientras que la línea horizontal punteada indica el valor de corte para discriminar entre positivos y negativos.....	164
5.16. Curvas ROC obtenidas al enfrentar un panel de 50 sueros a distintos complejos látex-proteína: a) R2-CP1 (pET32a); b) R2-CP1 (pET24a).....	165
5.17. Distribución de la ΔA relativa para un panel de 25 sueros positivos y 25 sueros negativos, utilizando los complejos R2-CP1 (pET32a); y R2-CP1 (pET24a). Los segmentos horizontales continuos muestran los valores medios en cada ensayo, mientras que la línea horizontal punteada indica el valor de corte para discriminar entre positivos y negativos.....	166
5.18. Análisis de la reactividad en el tiempo de los complejos látex-proteína al ser enfrentados a los sueros control. a) R2-FRA (pET32a); b) R2-CP1 (pET24a). La barra verde oscuro representa ael suero positivo y la verde claro al suero negativo.....	169

5.19. Influencia de la concentración de proteína antigénica unida sobre el IA utilizando los sueros controles. a) A1-FRA; b) A2-FRA; c) A1-CP1; d) A2-CP1. La barra verde oscuro representa al suero positivo y la verde claro al suero negativo.....	170
5.20. Reactividad en el tiempo de los complejos látex-proteína tratados y sin tratar con BH_4Na . a) A1-FRA; b) A1-FRA con BH_4Na ; c) A1-CP1; d) A1-CP1 con BH_4Na . La barra verde oscuro representa al suero positivo y la verde claro al suero negativo.....	173
5.21. Curvas ROC obtenidas al enfrentar un panel de 30 sueros a distintos complejos látex-proteína a) A1-FRA; b) A1-CP1.....	175
5.22. Distribución de ΔA relativa para un panel de 15 sueros positivos y negativos, utilizando los complejos A1-CP1 y A1-FRA. Los segmentos horizontales continuos muestran los valores medios en cada ensayo, mientras que la línea horizontal punteada indica el valor de corte para discriminar entre positivos y negativos.....	175
5.23. Distribución de ΔA relativa para un panel de 15 sueros positivos y negativos, utilizando los complejos R2-CP1 y A1-CP1. Los segmentos horizontales continuos muestran los valores medios en cada ensayo, mientras que la línea horizontal punteada indica el valor de corte para discriminar entre positivos y negativos.....	176

PROLOGO

El objetivo del trabajo de investigación fue obtener partículas de látex sensibilizadas con proteínas antigénicas, para ser usadas como reactivo de inmunodiagnóstico en la detección de la Enfermedad de Chagas. El trabajo se puede dividir en cuatro etapas: a) síntesis controlada, limpieza y caracterización de látex funcionalizados; b) síntesis de las proteínas utilizadas; c) sensibilización de las partículas con proteínas antigénicas del *T. cruzi*; y d) aplicación de los distintos complejos látex-proteína en ensayos de inmunoaglutinación

En el Capítulo 1, se introducen los principales antecedentes y conceptos relacionados con: i) la síntesis, la caracterización y la sensibilización de látex de inmunodiagnóstico; ii) la producción y purificación de proteínas recombinantes; y iii) la aplicación de un inmunoensayo.

El Capítulo 2, se refiere a la producción de partículas con morfología tipo núcleo-coraza (o "core-shell"), con grupos funcionales y densidades de carga superficial controlados. En particular se estudia la copolimerización en emulsión del estireno y del ácido metacrílico, y del estireno y de la acroleína dietil acetal sobre una siembra monodispersa de poliestireno sintetizada en una etapa previa. Se pretende obtener partículas con grupos carboxilo y acetal superficiales, que son necesarios como puntos de fijación para las proteínas. Los látex obtenidos se caracterizan por microscopía electrónica, dispersión de luz dinámica y turbidimetría, para determinar los tamaños medios de las partículas. Además, se realiza la caracterización superficial de los látex, determinando la densidad de carga superficial, y la naturaleza y densidad de los grupos

funcionales superficiales mediante titulación conductimétrica; y la estabilidad coloidal, a partir de mediciones de la concentración crítica de coagulación.

En el Capítulo 3, se considera la obtención de las proteínas antigénicas del *T. cruzi* que se utilizarán para sensibilizar las partículas de látex. Se trabaja con una mezcla de proteínas obtenidas a partir de la lisis del parásito (homogenato); y con proteínas recombinantes, cuya obtención involucra su expresión a partir de bacterias transformadas, su purificación y su cuantificación.

En el Capítulo 4, se describe la preparación de los complejos látex-proteína mediante la adsorción física de los antígenos de interés sobre partículas de PS y a través de la unión covalente de las proteínas antigénicas con los grupos superficiales de las partículas tipo “core-shell” con funcionalidad carboxilo o acetal. Se realiza luego la caracterización de los complejos, determinándose su concentración crítica de coagulación y sus tamaños medios mediante dispersión de luz dinámica a múltiples ángulos y turbidimetría.

En el Capítulo 5, se muestra la aplicación de los distintos complejos látex-proteína sintetizados previamente en ensayos de inmunoaglutinación. Mediante turbidimetría, se analiza la influencia de las condiciones del medio de reacción sobre la respuesta del inmunoensayo; y luego se evalúa la sensibilidad y especificidad del ensayo con los distintos complejos látex-proteína. Finalmente, se muestran algunos resultados de los ensayos de inmunoaglutinación por el método visual.

Finalmente, en el Capítulo 6 se extraen las conclusiones principales de la Tesis y se realizan algunas sugerencias para trabajos futuros.

CAPITULO 1

CONSIDERACIONES GENERALES

1.1. INTRODUCCION

La Enfermedad de Chagas, causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, es la cuarta enfermedad parasitaria más importante a nivel mundial, después de la malaria, la esquistosomiasis y la parasitosis intestinal, y es una de las enfermedades parasitarias más importantes de América Latina. Además, debido al riesgo de infección congénita y/o transmisión por transfusión de sangre infectada, esta enfermedad se ha convertido en un gran problema en regiones no endémicas, sobre todo por el incremento en la migración de personas desde Centro y Sur América hacia países desarrollados, habiéndose documentado casos en los Estados Unidos y Europa.

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010) calcula que unos 10 millones de personas están infectadas, principalmente en América Latina, donde la Enfermedad de Chagas es endémica y que más de 25 millones de personas están a riesgo de adquirirla. Además de todas las enfermedades transmitidas por vectores, la Enfermedad de Chagas es la más asociada a condiciones de pobreza, no existiendo aún una vacuna contra la enfermedad, ni un método satisfactorio y confiable de tratamiento etiológico para erradicar el parásito, ni para evitar la aparición o progresión de lesiones viscerales e interferir en la cadena de transmisión.

La prevención y el diagnóstico son las principales armas para controlar la enfermedad. Sin diagnóstico efectivo no se pueden identificar y por ende tratar a los

individuos infectados, y la eficacia del tratamiento específico es difícil de evaluar. Más aún, la efectividad de cualquier campaña de control, ya sea dirigida a vectores, bloqueo de la transmisión o vacunación de poblaciones, no puede ser medida sin un competente sistema de diagnóstico.

El diagnóstico, se basa en el uso integrado de tres herramientas importantes, que son: clínica, epidemiología y laboratorio. Los exámenes a realizar en el laboratorio dependerán de la etapa clínica que curse el paciente. En la etapa inicial de la enfermedad se encuentran parasitemias importantes, por lo que el estudio se basa en la búsqueda del *T. cruzi* en sangre. En las etapas latente y crónica las parasitemias son transitorias, por lo que la detección del parásito es muy difícil. El diagnóstico se confirma por la demostración de los anticuerpos (Ac) contra *T. cruzi* en el suero mediante técnicas como Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), Hemaglutinación Indirecta (HAI), o Aglutinación de Partículas.

Ninguno de los métodos antes mencionados es cien por ciento confiable por lo que la OMS recomienda el uso de por lo menos dos técnicas complementarias, basadas en diferentes metodologías o en diferentes preparaciones antigénicas, para identificar a un paciente como chagásico. En caso de disparidad se usa una tercera reacción para definir el estado de infectado.

La mayoría de los ensayos serológicos presentan dificultad para dar un diagnóstico en casos agudos o congénitos y suelen dar lugar a frecuentes falsos positivos, debido a que se basan en la detección de Ac en contra de las proteínas totales del *T. cruzi* (antígenos obtenidos de la lisis del parásito), algunos de los cuales presentan reacción cruzada con diferentes especies de *Leishmania* por tratarse de determinantes antigénicos comunes de los tripanosomátidos. Además, las condiciones de cultivo del parásito y de purificación de antígenos (Ag) son difíciles de estandarizar, por lo que llevan a resultados

variables entre lotes. Esta situación, atribuida a una falta de conocimiento acerca de la composición de los Ag utilizados, así como también a la inmunogenicidad del *T. cruzi* en humanos, representa un gasto enorme de muestras y recursos, lo cual podría ser evitado de realizar un ensayo certero sobre las muestras.

La aplicación de la tecnología del ADN recombinante, ha permitido la producción de Ag del parásito de distinto peso molecular, o de diferentes estadios del parásito en grandes cantidades, con un alto grado de pureza y calidad estandarizada. La sustitución de los Ag nativos por Ag recombinantes del *T. cruzi* en inmunoensayos, además de tener ventajas en términos de la definición química y del costo de producción, podría resolver el problema de los frecuentes falsos positivos manteniendo una alta sensibilidad.

El objetivo final de este trabajo de Tesis es la obtención de partículas de polímero sensibilizadas con Ag del *T. cruzi*, que puedan actuar como reactivo de inmunoaglutinación para detectar la Enfermedad de Chagas.

1.2. SINTESIS DE LATEX FUNCIONALIZADOS

1.2.1. Producción de Partículas por Polimerización en Emulsión

La teoría de polimerización de emulsión, fue establecida por Harkins (1946) y por Smith y Ewart (1948), siendo el caucho de estireno (St) y butadieno el primer polímero sintetizado a nivel comercial por polimerización en emulsión durante la Segunda Guerra Mundial.

En la actualidad las polimerizaciones en emulsión ocupan un lugar destacado entre las técnicas de síntesis de polímeros por vía radicalaria ya que permiten obtener dispersiones coloidales de partículas de polímero de muy alto peso molecular a altas velocidades de polimerización y con un adecuado control de la temperatura, por la baja

viscosidad y alta capacidad calorífica del medio acuoso de reacción. El empleo del agua como medio de dispersión tiene como ventaja adicional abaratar el proceso y reducir la contaminación ambiental y la toxicidad del material obtenido.

El producto de la polimerización en emulsión se denomina *látex*. Los látex han sido producto de una extensa investigación debido a que es relativamente sencillo controlar el tamaño y la morfología de las partículas durante la síntesis, así como sus características superficiales, mediante una adecuada elección de la receta de reacción, de las condiciones bajo las cuales la reacción ocurre, del tipo de reactor, y de las estrategias de operación, lo que permite adaptar cada vez mejor las características del látex a la aplicación final prevista.

Debido a que la polimerización en emulsión es un proceso heterogéneo complejo, son muchos los componentes incluidos en la formulación de un látex y todos ellos pueden afectar sus propiedades. Los componentes principales incluidos en dicho proceso son:

Agua: es la fase continua e inerte del sistema. Actúa manteniendo baja la viscosidad, como agente de transferencia de calor, y como el medio de transferencia del monómero desde las gotas a las partículas; siendo además el sitio donde ocurre la iniciación, el intercambio dinámico de emulsionantes entre las fases y a menudo la formación de oligómeros. Por lo general se utiliza agua deionizada, ya que puede haber problemas de estabilidad si se emplea agua con un alto contenido de cationes multivalentes, que también pueden afectar el tamaño de las partículas. Respecto de los componentes orgánicos del agua, normalmente son muy bajos como para acarrear problemas en la polimerización. Sin embargo, si el contenido de oxígeno es elevado, se puede demorar el inicio de la polimerización, debiéndose desoxigenar el agua para evitar el problema de inhibición o retardo de la reacción.

Monómeros: son las unidades que reaccionan durante la polimerización para producir los polímeros. Cada monómero tiene una estructura química especial, la cual tiene un gran impacto sobre las propiedades del polímero resultante. De este modo, la selección del monómero debe realizarse teniendo en cuenta que el polímero resultante satisfaga el uso final que se dará al mismo. El monómero es normalmente una sustancia orgánica con una solubilidad en agua relativamente baja. Cuando se mezclan el agua y el monómero, el sistema se separa en dos fases: una continua rica en agua (fase acuosa) y una dispersa rica en monómero (fase orgánica). En un sistema agitado, la fase orgánica se halla suspendida en forma de gotas.

Emulsificantes: son compuestos de bajo peso molecular que normalmente contienen una larga cadena de naturaleza hidrofóbica con un extremo hidrofílico. Cumplen una función dual: i) generando sitios para la formación de partículas cuando su concentración en el agua aumenta por encima de un cierto valor, conocido como la concentración micelar crítica (CMC), donde las moléculas del emulsificante no pueden permanecer aisladas y forman agregados llamados micelas, con el grupo hidrófobo de la molécula orientado hacia el interior y el grupo hidrófilo orientado hacia la fase acuosa; y ii) estabilizando las gotas de monómero y las partículas de polímero producidas durante la polimerización. Los emulsionantes más comúnmente utilizados en polimerización en emulsión son aniónicos, habitualmente en combinación con emulsionantes no iónicos que permiten controlar la morfología de la partícula de látex y mejorar la estabilidad coloidal post-polimerización.

La presencia de emulsificantes en látex poliméricos es desaconsejable para ciertas aplicaciones bioquímicas. En caso de que se desee utilizar las partículas para realizar experimentos de sensibilización con proteínas, el emulsificante presente en la superficie de las mismas impedirá que la adsorción sea máxima. Por otro lado, el uso de

emulsificantes no es indispensable para que tenga lugar la polimerización en emulsión, así como para poder obtener un látex estable. En este caso, las partículas no se producen a partir de las micelas del surfactante sino por nucleación homogénea debido a la coagulación de macromoléculas producidas en fase acuosa.

Iniciador: suele ser una sal inorgánica soluble en agua que se disocia formando radicales libres muy activos, de vida media muy corta, que inician la polimerización. La reactividad de dichos radicales se transfiere a una molécula de monómero, la cual a su vez podrá adicionarse a otra unidad monomérica sin perder su reactividad, produciendo una reacción en cadena.

Para llevar a cabo una polimerización en emulsión en presencia de emulsificante, se disuelve este último en agua y cuando su concentración supera la CMC, se generan micelas. Cuando se adiciona el monómero, parte del mismo se incorpora en las micelas, otra fracción forma gotas que quedan dispersas en el medio acuoso y una pequeña parte queda disuelta en el agua. Luego, se agrega un iniciador y se desarrolla un proceso de polimerización radicalaria que incluye a la iniciación, la propagación, y la terminación. En la primera de ellas, el iniciador se descompone y genera radicales libres a una velocidad que depende de su naturaleza, de la temperatura y del pH del medio. Estos radicales entran a las micelas para reaccionar con el monómero que está dentro de ellas y así iniciar la reacción de polimerización.

Una vez que comienza la polimerización, la micela se transforma en una partícula de polímero. Debido a la compartimentalización de la polimerización en las partículas, la concentración de radicales y la velocidad de terminación en ellas es baja, lo que hace que los pesos moleculares del polímero producido puedan crecer hasta valores muy elevados. El aumento de la temperatura de reacción y/o de la concentración de iniciador, normalmente permiten aumentar la velocidad de polimerización

Dentro de las partículas de polímero, el monómero se consume en las reacciones de propagación, transfiriéndose el monómero desde las gotas (cuando ellas existen) hacia las partículas de polímero. Como las gotas de monómero presentan un área superficial mucho más pequeña que las micelas y las partículas, aquellas no compiten con estas últimas en la captura de los radicales producidos en la fase acuosa (Fig. 1.1).

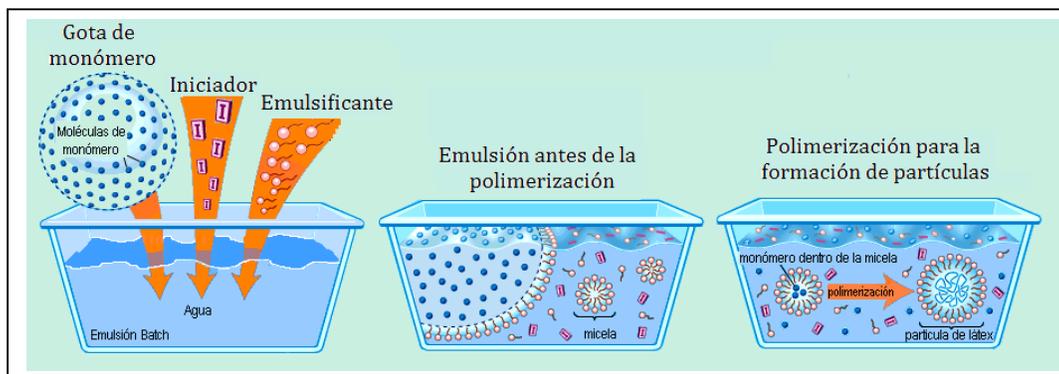


Figura 1.1. Proceso de polimerización en emulsión.

En la polimerización en emulsión pueden distinguirse tres intervalos diferentes. El *intervalo I*, se refiere a la nucleación de las partículas, y comienza con la generación de radicales libres y procede hasta que el número de partículas alcanza un valor constante. Hacia el final de dicho intervalo el emulsificante ha sido principalmente adsorbido por las partículas para estabilizarlas y una menor fracción del mismo se encuentra disuelto en fase acuosa y estabilizando las gotas de monómero y otras interfases.

El *intervalo II* comienza cuando ha terminado la formación de partículas y finaliza cuando el monómero, presente como una fase separada en forma de gotas, desaparece. Durante el mismo, la concentración de monómero en las partículas se mantiene constante en las condiciones de saturación.

Por último, en el *intervalo III* sólo coexisten la fase acuosa y las partículas de polímero, la concentración de monómero en estas últimas disminuye, y el volumen de las

partículas (hinchadas con monómero) también disminuye ligeramente debido a la diferencia de densidades del polímero respecto al monómero (contracción volumétrica).

Las polimerizaciones en emulsión pueden llevarse a cabo bajo procesos de producción de tipo discontinuo (“batch”), semicontinuo (“semibatch”), o continuo. En el proceso discontinuo (Fig. 1.2.a), todos los componentes se añaden al principio de la polimerización. Este proceso puede acarrear problemas en el control de: i) la temperatura de reacción, especialmente cuando se utilizan recetas de alto contenido de sólidos (relación monómero/agua); ii) los pesos moleculares del producto y/o la composición del copolímero, particularmente cuando se emplean comonómeros de reactividades muy diferentes; y iii) la densidad de grupos superficiales y la estabilidad del sistema coloidal; etc.

En el proceso de polimerización semicontinuo (Fig. 1.2.b), uno o varios componentes se añaden a lo largo de la polimerización. De esta manera, se pueden generar perfiles de nucleación y de crecimiento de las partículas de acuerdo a cómo se adicionen los diferentes reactivos. Este tipo de proceso permite controlar la velocidad de polimerización, la estabilidad coloidal, el peso molecular del polímero, la composición del copolímero, y la morfología de partícula.

En el proceso de polimerización continuo (Fig. 1.2.c), los reactivos se alimentan continuamente y el producto se extrae a la misma velocidad. Entre sus ventajas se pueden mencionar la alta velocidad de producción de polímero, la facilidad de evacuación del calor de reacción, y la mayor uniformidad de calidad de los látex.

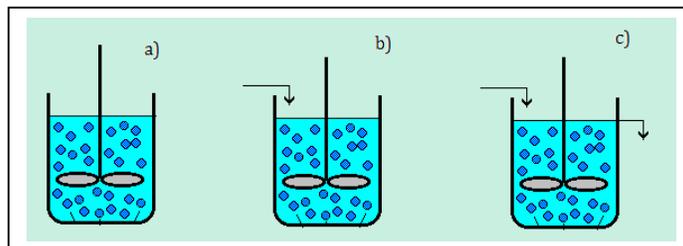


Figura 1.2. Procesos de producción: a) discontinuo; b) semicontinuo; c) continuo.

Algunos métodos particulares de adición semicontinua incluyen la adición intermitente y la adición en pulso de uno o varios de los reactivos. En el proceso de adición por pulso, ciertos reactivos se añaden a tiempos determinados, en etapas avanzadas de la polimerización, antes de la conversión completa del monómero principal. Este método ha sido usado satisfactoriamente para desarrollar partículas funcionalizadas (Gonzalez, 2004; Gonzalez *et al.*, 2008a).

1.2.2. Síntesis de Partículas Funcionalizadas

Los procesos de polimerización en emulsión son de gran importancia industrial ya que, variando la concentración y la naturaleza del monómero principal, el iniciador, el emulsificante, los monómeros reactivos o funcionales, la fuerza iónica (I) y el pH del medio de reacción, se pueden obtener sistemas coloidales con diferentes tamaños de partícula, morfología, grados de monodispersidad y características superficiales. Por otra parte, estos sistemas coloidales están constituidos por partículas poliméricas de pequeño tamaño suspendidas en un medio acuoso, lo cual proporciona un gran área superficial para actuar de soporte de biomoléculas.

La estructura y morfología de las partículas de látex es de suma importancia, pues ayuda a mejorar las características del producto. Existen micro/nanopartículas lisas o compactas, peludas o "hairy", y funcionalizadas o reactivas, que permiten controlar el balance hidrofílico-hidrofóbico en la interfase agua-polímero e introducir grupos superficiales reactivos capaces de unirse covalentemente a biomoléculas (Fig. 1.3).

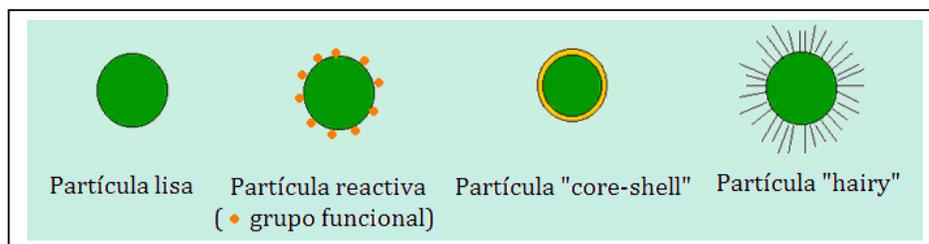


Figura 1.3. Morfología de las partículas de látex.

Existen diferentes métodos que permiten producir partículas funcionalizadas, siendo uno de ellos la polimerización en emulsión de monómeros funcionales sobre partículas de látex para la producción de partículas con morfología núcleo-coraza o “core-shell”. Éste es un proceso de polimerización “multipaso” o “sembrado”, donde la partícula “core” usualmente de poliestireno (PS) se sintetiza en una primera etapa, y el monómero funcional se añade en una segunda etapa de la polimerización, generando así la “shell” funcionalizada sobre la partícula “core”.

La polimerización de emulsión sembrada es un método útil para producir partículas monodispersas en tamaño, con un control de la morfología, tamaño y densidad de carga superficial de las mismas. En la polimerización en emulsión sembrada, el látex “de siembra” pre-sintetizado se utiliza para controlar el tamaño y el número de partículas presentes en el látex final.

Las partículas de látex con morfología “core-shell” han cobrado un creciente interés debido a la versatilidad de aplicación. Éstas son útiles en una amplia gama de usos, ya que poseen mejores propiedades físicas y químicas respecto a las partículas formadas por un único componente. Además, son perfectos sistemas modelos para investigar las propiedades de mezclas de polímeros y de polímeros compuestos, debido a la regular distribución de un polímero dentro de una matriz polimérica y a la geometría esférica simple del sistema.

Las partículas “core-shell” se utilizan en muchas aplicaciones biomédicas, particularmente como soporte en inmunoensayos, liberación controlada de drogas, y separaciones de células sanguíneas. Así, la adsorción y/o unión de proteínas sobre superficies poliméricas sólidas que se tratará en esta Tesis se ha convertido en un importante tema de estudio.

Se han utilizado numerosos grupos funcionales con el fin de unir proteínas sobre la superficie de las partículas de látex para ser utilizadas en inmunoensayos: i) aldehído (Yan *et al.*, 1990; Charleux *et al.*, 1992; Bastos *et al.*, 1994; Slomkowski *et al.*, 2002); ii) carboxilo (Bahadur *et al.*, 1985; Bastos-Gonzales *et al.*, 1995; Gonzalez *et al.*, 2008b); iii) acetal (Kapmeyer *et al.*, 1988; Kapmeyer *et al.*, 1991; Peula *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 1996; Bucsi *et al.*, 1998; Sarobe *et al.*, 1998; Miraballes y Forcada 2000; Gibanel *et al.*, 2001; Miraballes *et al.*, 2001; Santos y Forcada, 2001; Sanz-Izquierdo *et al.*, 2004); iv) hidroxilo (Okubo *et al.*, 1987); v) amino (Delair *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 2003; Sanz-Izquierdo *et al.*, 2004); y vi) clorometilo (Suen *et al.*, 1985; Sarobe *et al.*, 1996; Sarobe *et al.*, 1998; Sanz-Izquierdo *et al.*, 2004).

La variedad de partículas más frecuente es aquella que contiene grupos funcionales carboxilo (-COOH). Estos grupos permiten la unión de proteínas vía la formación de un enlace amida, después de ser activados con carbodiimidas solubles.

En orden de importancia, la siguiente modificación superficial involucra a los grupos amino (-NH₂). Inicialmente, estas partículas fueron preparadas por nitración/reducción de partículas de PS, pero los grupos amino aromáticos resultantes eran poco reactivos, y además la reacción orgánica empleada provocaba la agregación de las partículas. Debido a esto, se desarrollaron otros procedimientos de síntesis para incrementar la reactividad de las partículas, como por ejemplo, la copolimerización del St con un monómero conteniendo grupos amino. Los grupos amino así introducidos son más fáciles de activar (por ejemplo, con glutaraldehído) y pueden formar enlaces covalentes con distintos ligandos (Quash *et al.*, 1978).

Nustad *et al.* (1982) utilizaron partículas funcionalizadas con grupos hidroxilo (-OH) en su superficie para la inmovilización de Ac. Estas partículas se prepararon mediante una copolimerización de metacrilato de metilo con metacrilato de hidroxietilo y dimetacrilato de etilenglicol, y fueron posteriormente activadas con cloruro de sulfonilo

como agente de acoplamiento, obteniéndose un buen rendimiento en el enlace covalente del Ac.

Para simplificar el acoplamiento covalente de ligandos, se dispone actualmente de partículas con grupos funcionales que no requieren una activación previa al acoplamiento. Entre estos grupos, se encuentran los clorometilos (-CH₂Cl), que reaccionan directamente con los grupos amino de las proteínas.

También existen técnicas para preparar partículas con grupos aldehído (-CHO) en la superficie (Margel *et al.*, 1982; Bastos-González *et al.*, 1994), los cuales reaccionan con los grupos amino de ligandos formando iminas. Sin embargo, debido a la inestabilidad de los mismos, generalmente se preparan partículas con grupos acetal en la superficie. Los grupos acetal se transforman en grupos aldehídos con una simple acidificación (Kapmeyer *et al.*, 1988), y los grupos aldehídos así obtenidos no precisan de ninguna reacción previa para unirse covalentemente con las proteínas.

Partículas de PS con grupos diazo (-N=N-) en la superficie se han aplicado con éxito en el diagnóstico de la Leptospirosis y otras enfermedades infecciosas (Liu *et al.*, 1989). Los grupos fenol e imidazol de los Ac pueden reaccionar con estos grupos diazo mediante enlaces covalentes, siendo la reacción de acoplamiento extremadamente rápida aún a bajas temperaturas. La preparación de este látex inmunológico se realiza en varias etapas: síntesis de PS, polinitroestireno, poliaminoestireno y polidiazostireno, obteniéndose grupos diazo muy activos en la superficie de las partículas.

La mayor parte de las partículas que suministra la industria del inmunodiagnóstico, para la detección de numerosas biomoléculas en diferentes fluidos biológicos, tienen algunas de las funcionalidades arriba indicadas, y se las sintetiza tanto en presencia como en ausencia de emulsificante (Miraballes-Martínez *et al.*, 1997; Caballero *et al.*, 1999; Santos y Forcada., 2001; Peula-García *et al.*, 2002; Ramos *et al.*,

2003; Lucas *et al.*, 2006; Polpanich *et al.*, 2007; Dey *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008). El proceso de aglutinación involucrado en el inmunoensayo es de sencilla realización e interpretación, y presenta relativamente alta sensibilidad analítica (Kawaguchi, 2000). Además, la sencillez de esta prueba la hace especialmente útil en aquellos laboratorios con escaso personal y equipamiento. Con esta idea y ante las ventajas obvias de utilizar un soporte inerte y estable, se decidió estudiar la posibilidad de su aplicación en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.

1.3. LIMPIEZA Y CARACTERIZACION DE LOS LATEX

1.3.1. Métodos de Limpieza

Antes de poder caracterizar a las partículas de látex, es necesario retirar los restos de monómero e iniciador no reaccionados y las cadenas de polielectrolitos que se puedan haber formado durante la reacción, para evitar que los mismos puedan sufrir alteraciones químicas posteriores, interactuar con la superficie, interferir en el ensayo inmunológico y disminuir la unión de proteínas.

Ninguna técnica por sí sola es capaz de eliminar todas las impurezas. El proceso de limpieza sólo se puede evaluar adecuadamente después de identificar la naturaleza de las impurezas. Aquí reside el principal problema, ya que en comparación con otras superficies, el tipo, nivel y cantidad de impurezas son muy variables en un látex. Es preciso, además, evitar la introducción de nuevas impurezas que puedan estar presentes en el equipo, materiales y en el agua utilizada para la limpieza, así como también la posible contaminación con bacterias y hongos. Estos factores deben tenerse en cuenta también a la hora de almacenar las partículas. Además, el proceso de limpieza debe eliminar las impurezas, sin afectar la naturaleza del látex (morfología y tamaño de partícula, concentración de grupos funcionales superficiales).

Si las partículas de látex son químicamente estabilizadas por grupos cargados, éstos son claramente una parte integral de las partículas y el proceso de limpieza no debe quitarlos o modificarlos. Muy a menudo, las partículas de látex son estabilizadas por emulsionantes, y la eliminación de éstos mediante la limpieza, dará lugar a la inestabilidad y a la agregación.

Existen varios métodos de purificación, y cada uno de ellos presenta ventajas y desventajas. En la *diálisis*, el látex se introduce en membranas (normalmente de celulosa regenerada) y estas se sumergen en agua ultrapura con una proporción de agua aproximadamente 20 veces mayor al contenido de látex. Después de unos 20 cambios de agua, que ocurre durante un período de 3-4 semanas, la conductividad del líquido de diálisis es igual a la del agua destilada empleada (Fig. 1.4.).

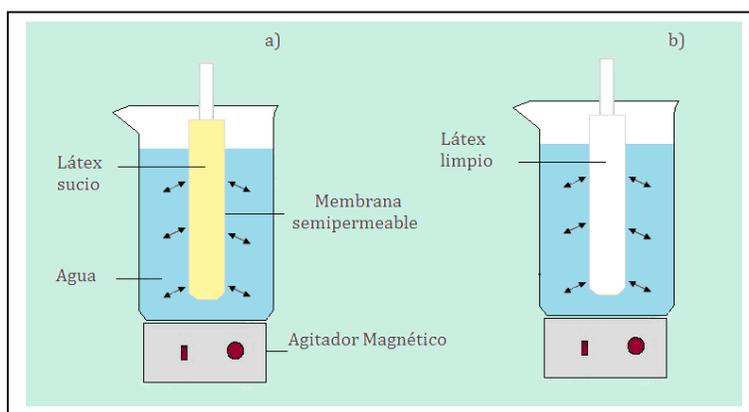


Figura 1.4. Representación esquemática del equipo de diálisis. Condición: a) al comienzo; y b) al final del proceso.

La fuerza impulsora para el intercambio de materiales a través de la membrana es el potencial químico de los iones, que es alto en el lado del látex y bajo en el lado del agua. El movimiento de iones cesa cuando se alcanza la concentración iónica de equilibrio a ambos lados de la misma.

Hay problemas importantes asociados con esta técnica (Yates *et al.*, 1997; Everett *et al.*, 1979; Hearn *et al.*, 1981). Por un lado, debido a que el proceso de diálisis

tiene una duración prolongada, existe la posibilidad de contaminación del sistema. Además, un tiempo de diálisis prolongado puede modificar la naturaleza de los grupos superficiales. Por otra parte, no elimina por completo el monómero residual, los oligómeros de la superficie de partículas y los subproductos de la reacción. Por último, genera un intercambio incompleto de contraiones Na^+ y K^+ por iones H^+ , y esto puede hacer subestimar a los grupos ácido superficiales cuando se determinan por titulación conductimétrica en la caracterización posterior del látex. Sin embargo, sigue siendo un procedimiento muy utilizado.

El método de *desplazamiento de suero* (o “serum replacement”) se basa en el reemplazo de la fase acuosa o serum del látex con agua destilada y deionizada (El-Aasser *et al.*, 1980; Ahmed *et al.*, 1980; Daniels *et al.*, 1981). El látex se coloca en una celda cilíndrica con un filtro y se bombea agua destilada y deionizada a través de la celda. El fluido se ve obligado, bajo presión hidrostática, a atravesar el filtro, cuyo tamaño de poro es menor que el de las partículas, de modo que sólo permita el paso de las impurezas y del agua. El látex se lava continuamente hasta que la conductividad del eluyente iguale a la del agua de alimentación (Fig. 1.5.). Como el flujo de alimentación es perpendicular a la superficie de la membrana, las ventajas del aumento de la presión son reducidas por la obstrucción de los poros debido a la acumulación de una capa superficial de partículas sobre la membrana que produce un bloqueo en el flujo. Para evitar esto, es esencial una rápida y eficaz mezcla del látex durante el lavado. Este problema se hace más pronunciado a medida que aumenta el contenido de sólidos de la muestra.

La técnica de desplazamiento de suero es sencilla, rápida, efectiva, y puede emplearse también para concentrar un látex. Además, permite eliminar no sólo las especies disueltas en fase acuosa sino también las adsorbidas en las partículas poliméricas y reemplazar completamente a los iones sodio y potasio por protones (Ahmed *et al.*,

1980). Otra ventaja de esta técnica es que se puede emplear una variedad de filtros de diferente composición y permite recuperar la fase acuosa para su análisis.

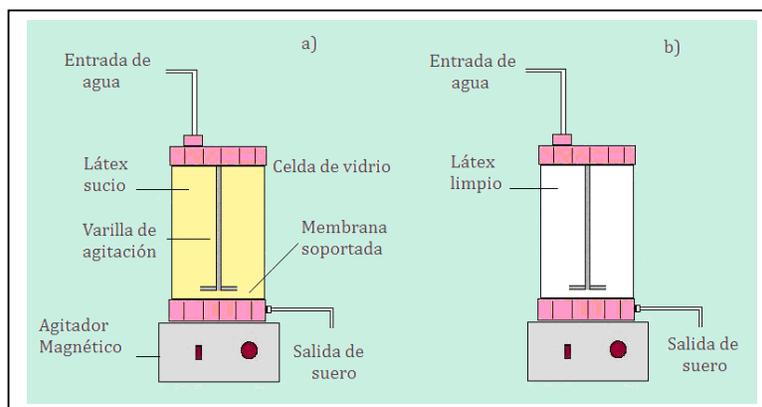


Figura 1.5. Representación esquemática del equipo de desplazamiento de suero. Condición: a) al comienzo; y b) al final del proceso.

El método de *centrifugación-resuspensión* consiste en la sedimentación de las partículas de látex junto con su capa adsorbida, dejando un sobrenadante con los ingredientes no sedimentables de pequeño tamaño o disueltos. La operación de centrifugación/decantación y posterior resuspensión se repite hasta que la conductividad del sobrenadante sea igual a la del agua ultrapura de lavado. Esta técnica tiene la mayor parte de las ventajas de la técnica de desplazamiento de suero, pero además permite limpiar látex con altos contenidos de sólidos. Sin embargo, los látex se hacen más difíciles de redispersar en cada ciclo y en los últimos generalmente se requiere de sonicación. Además, la técnica es tediosa y algunos látex pueden perder la estabilidad, generando agregación irreversible.

1.3.2. Caracterización Morfológica y Superficial

Es importante pensar en la aplicación de los látex a la hora de diseñar sus síntesis. Por lo general, los látex deben cumplir ciertos requisitos como: i) monodispersidad de tamaño de partícula, a fin de controlar la superficie disponible y

garantizar reproducibilidad; ii) composición; iii) densidad de carga superficial; y iv) estabilidad coloidal.

El tamaño de partícula es fundamental para el funcionamiento adecuado de un ensayo. El tamaño determina el área superficial. Las partículas de diámetro pequeño presentan una mayor superficie por unidad de masa, mientras que las partículas grandes presentan un área superficial menor.

La composición es muy importante ya que los distintos monómeros que se pueden emplear en la síntesis presentan diferentes propiedades físicas y ópticas, que pueden dar lugar a ventajas o limitaciones para diferentes aplicaciones.

En la actualidad, existen muchas técnicas de polimerización apropiadas para la preparación de partículas de látex que pueden satisfacer la mayoría de los requisitos antes mencionados. Sin embargo, la polimerización en emulsión es la más popular.

1.3.2.1. Caracterización de Tamaños de Partícula

El control del tamaño de partícula y la distribución uniforme de tamaños es un requerimiento muy importante para predecir el comportamiento de las partículas, definir el área superficial disponible para la unión de macromoléculas biológicamente activas y determinar el mejor proceso de manipulación.

En la práctica, es casi imposible obtener un látex estrictamente monodisperso; y típicamente, los denominados látex “monodispersos” suelen aparecer contaminados por pequeñas fracciones de partículas de un tamaño superior al de la población principal.

Se pueden utilizar diferentes técnicas para determinar el tamaño de las partículas, presentando cada una un conjunto de ventajas y limitaciones. La *microscopía electrónica* (ME), en sus versiones de transmisión (TEM) y de barrido (SEM), es la técnica

de observación directa más poderosa para la medición de tamaños de partícula. Sin embargo, es difícil detectar y cuantificar pequeñas fracciones de partículas muy distintas a la mayoría, las partículas tienden a aglomerarse durante el proceso de secado producido durante la preparación de la muestra, y el haz de electrones puede producir alteraciones en la morfología de las partículas al ser observadas.

La técnica de *Dispersión de Luz Dinámica* (DLS) permite determinar tamaños medios de partícula en forma simple, rápida y confiable. En ella, una luz láser (monocromática) incide sobre una muestra de látex diluida, y un fotómetro colocado a un ángulo fijo θ , mide las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada provocada por las partículas, durante un intervalo de tiempo de décimas de microsegundos a milisegundos (Fig. 1.6).

Cuando un haz de luz pasa a través de una dispersión coloidal, las partículas dispersan parte de la luz en todas direcciones. Si las partículas se mantuvieran inmóviles, entonces la intensidad de luz dispersada sería constante. Sin embargo, como las partículas presentan movimiento Browniano, las mismas se acercan o alejan del detector, generando fluctuaciones temporales en la intensidad de luz dispersada.

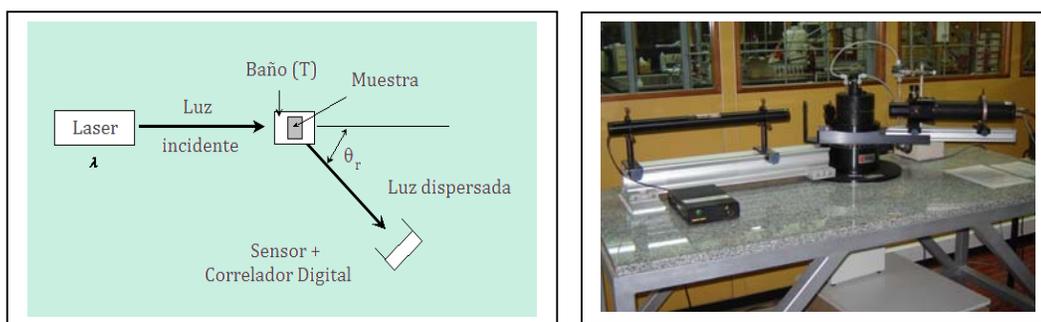


Figura 1.6. Representación esquemática y fotografía del equipo de DLS utilizado.

El análisis de las fluctuaciones de la intensidad de luz dispersada permite determinar el coeficiente de difusión traslacional (d_T) de las partículas. La difusión está

esencialmente controlada por la temperatura, la viscosidad del medio y el tamaño de las partículas. Para una temperatura y un medio dado, la variación en la intensidad de la luz dispersada está directamente relacionada con el "tamaño hidrodinámico de partícula" que incluye la capa de hidratación.

Las fluctuaciones de la intensidad de luz dispersada se pueden describir a través de sus funciones de autocorrelación, que se definen como:

$$G_{\theta_r}^{(2)}(\tau_j) = \lim_{N_s \rightarrow \infty} \frac{1}{N_s} \sum_{k=1}^{N_s} \xi_{\theta_r}(\tau_k) \xi_{\theta_r}(\tau_{k+j}) \quad (1.1)$$

donde ξ_{θ_r} representa la intensidad de luz dispersada al ángulo de detección θ_r ; τ_j es el tiempo de decaimiento discreto; y N_s ($>10^6$) es el número total de muestras.

Si se supone a la distribución de tamaños de partícula (DTP) como monodispersa, la función de autocorrelación se puede ajustar mediante:

$$G_{\theta_r}^{(2)}(\tau_j) = G_{\infty, \theta_r}^{(2)} \left\{ 1 + \beta_r \left| g_{\theta_r}^{(1)}(\tau_j) \right|^2 \right\} \quad (j = 1, \dots, M_{DLS}), \quad (1.2)$$

con:

$$g_{\theta_r}^{(1)}(\tau_j) = \exp(-\Gamma_r \tau_j) \quad (j = 1, \dots, M_{DLS}), \quad (1.3)$$

donde $G_{\infty, \theta_r}^{(2)}$ es la línea de base de la función de autocorrelación; β_r (<1) es una constante "instrumental"; M_{DLS} es el número total de canales del correlador o puntos de la función de autocorrelación medida a θ_r ; y Γ_r es la constante de decaimiento característica de las partículas, que es el producto entre d_T y la norma del vector de onda q_r :

$$\Gamma_r = d_T q_r^2 \quad (1.4)$$

Según la ley de Stokes-Einstein para una partícula esférica y en un fluido Newtoniano, el coeficiente de difusión traslacional se relaciona con el diámetro medio de partícula mediante:

$$d_T = \frac{k_B T_0}{3 \pi \eta D} \quad (1.5)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann; T_0 es la temperatura absoluta; y η es la viscosidad del medio.

La norma del vector de onda q_r depende del ángulo de detección de la luz dispersada θ_r , del índice de refracción del medio de suspensión (n_m) y de la longitud de onda de la luz láser incidente (λ_{DLS}):

$$q_r = \frac{4 \pi n_m}{\lambda_{DLS}} \sin(\theta_r / 2) \quad (1.6)$$

En la práctica se mide la función de autocorrelación, se determina Γ_r a partir de las Ecs. (1.2) y (1.3), y se calcula D en base a las Ecs. (1.4) - (1.6) conociendo T_0 , η , y n_m . Sin embargo, el diámetro medido por DLS expresa el tamaño de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión traslacional que la partícula. Cualquier cambio en la superficie de la partícula que afecte su velocidad de difusión va a cambiar el tamaño aparente de la partícula ya que el coeficiente de difusión y, por ende, el tamaño hidrodinámico, no sólo depende del diámetro de las partículas a medir, sino también de la conformación de la misma en el medio en que está dispersa.

Para el caso más general de partículas polidispersas, se puede calcular un diámetro promedio de DLS, representado por D_{DLS} , a través del método de los cumulantes (Koppel, 1972), con una reproducibilidad del D_{DLS} de alrededor de $\pm 1\%$.

La técnica de DLS permite estudiar las muestras en su medio, medir tamaños con pequeños volúmenes de muestra y en rangos de concentración relativamente bajos, y recuperar la muestra luego de la medición. Además es útil para seguir procesos de coagulación, evaluando la formación y crecimiento de los agregados.

Probablemente el principal inconveniente de la DLS es que requiere de métodos especiales para el tratamiento de los datos cuando se desea estimar la DTP, no existiendo solución única.

En *turbidimetría* (T), las mediciones normalmente se realizan en un espectrofotómetro UV-visible. El espectro de turbidez representa la pérdida de intensidad de la luz (a 180°) después de atravesar una muestra de látex diluida, en función de la longitud de onda incidente, λ_j (Fig. 1.7).

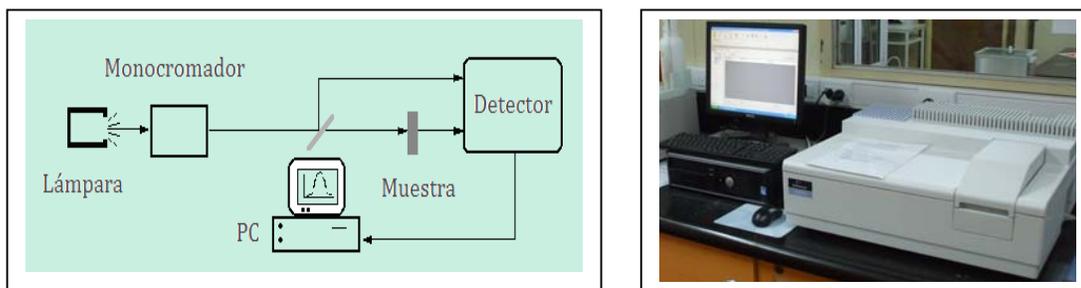


Figura 1.7. Representación esquemática y fotografía del espectrofotómetro utilizado.

El espectro de turbidez se representa mediante:

$$T(\lambda_j) = \frac{1}{l} \ln \left[\frac{I_0(\lambda_j)}{I(\lambda_j)} \right] \quad (j = 1, \dots, M_T) \quad (1.7)$$

donde l es la longitud de la celda del espectrofotómetro o camino óptico; I_0, I son las intensidades de los haces incidente y emergente, respectivamente (Kourti, 1989; Lloset et al., 1996); y M_T es el número de puntos del espectro de turbidez.

La absorbancia (A) se relaciona con la turbidez según:

$$A(\lambda_j) \equiv \log \left(\frac{I_0(\lambda_j)}{I(\lambda_j)} \right) \quad (1.8)$$

$$A(\lambda_j) = \frac{T(\lambda_j) l}{2.303} \quad (1.9)$$

La teoría de Mie (1908) permite relacionar el espectro de turbidez con el diámetro de las partículas uniformes según:

$$T(\lambda_j) = N_p Q_{\text{ext}} \left[\lambda_j, x(D, \lambda_j), m(\lambda_j) \right] \frac{\pi}{4} D^2 \quad (1.10)$$

$$x(D, \lambda_j) = \frac{\pi D}{\lambda_j} n_m(\lambda_j) \quad (1.11)$$

$$m(\lambda_j) = \frac{n_p(\lambda_j)}{n_m(\lambda_j)} \quad (1.12)$$

donde N_p es la densidad numérica (o concentración en número) de partículas, y la función Q_{ext} es el coeficiente de extinción calculado por la teoría de Mie, que depende del tamaño relativo $x(D, \lambda_j)$ y de la relación entre los índices de refracción de las partículas y del medio $m(\lambda_j)$. El tamaño relativo depende del diámetro de las esferas y de la longitud de onda.

Para la estimación de tamaños de partícula, idealmente la turbidez debería ser solamente una medida de la luz dispersada, y esto implicaría que la absorción de luz por parte de las partículas fuera despreciable (Kourti, 1989; Eliçabe y García-Rubio, 1990; Lloset *et al.*, 1996).

Si se reescribe la Ec. (1.10) en términos de la concentración másica de polímero, c , el diámetro puede calcularse en principio a partir de la medición de turbidez a una única longitud de onda según:

$$D(\lambda_j) = \frac{3c}{2\rho T(\lambda_j)} Q_{\text{ext}}(D, m, \lambda_j) \quad (1.13)$$

donde ρ es la densidad del polímero; y Q_{ext} se obtiene a partir de la teoría de Mie. Para obtener estimaciones adecuadas de D , se requieren valores razonablemente exactos de la relación c/ρ y de la relación de los índices de refracción $m(\lambda_j)$.

1.3.2.2. Caracterización Superficial de las Partículas

La caracterización superficial de las partículas permite conocer la naturaleza y la cantidad de grupos superficiales iónicos y no iónicos, y determinar las propiedades y el comportamiento coloidal de los látex.

Las partículas de látex son inherentemente inestables debido a su gran área superficial por unidad de masa, y se agregarán irreversiblemente a menos que se estabilicen. La estabilización se puede conseguir por adsorción de ciertos iones o por disociación de grupos superficiales ionizables del polímero provenientes del iniciador y de los diferentes monómeros empleados en la polimerización. Muchas propiedades de los sistemas coloidales acuosos están determinadas por la presencia de estos grupos químicos cargados sobre la superficie de las partículas.

La *valoración conductimétrica* es el método más usado para determinar la densidad de carga superficial. Consiste en el estudio de la evolución de la conductividad de la muestra frente al agregado de la disolución valorante. Representando la conductividad frente al volumen o masa del valorante adicionado, las variaciones en la pendiente de la curva indican los puntos finales de valoración de un grupo funcional concreto.

En el caso de una disolución de un ácido fuerte, inicialmente la conductividad es grande porque los iones H^+ tienen una movilidad muy alta. Conforme se va produciendo la neutralización de los iones H^+ con los iones OH^- , la conductividad disminuye lentamente debido a la menor movilidad de los iones Na^+ liberados. Alcanzado el punto de equivalencia, la concentración de OH^- empieza a aumentar conforme se va añadiendo $NaOH$ y con ella la conductividad. En consecuencia, representando la conductividad frente al volumen de hidróxido añadido, deben obtenerse dos rectas cuya intersección es el punto de equivalencia. Puesto que la movilidad de los iones OH^- es menor que la de los H^+ , la pendiente de la segunda recta será menor en valor absoluto.

En el caso de un ácido débil, inicialmente la ionización es muy pequeña, por lo que la conductividad es baja. Esto es porque aunque los iones H^+ tienen mucha movilidad, hay muy pocos. Al añadir $NaOH$ se van añadiendo iones Na^+ con lo que la conductividad aumenta lentamente. Sobrepasado el punto de equivalencia, la disolución incorpora iones OH^- , lo que se traduce en un aumento brusco de la conductividad (Fig. 1.8).

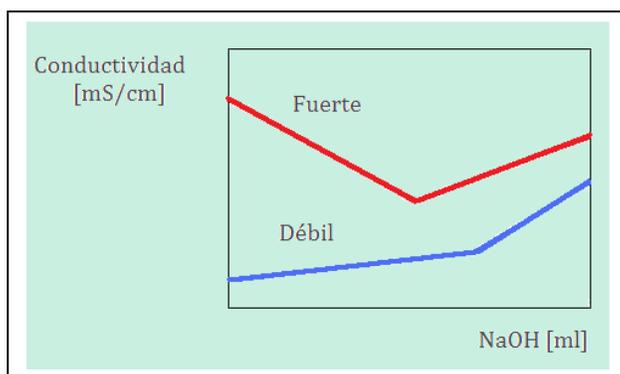


Figura 1.8. Diagrama de conductividad de un ácido fuerte y de un ácido débil frente al volumen de solución valorante de $NaOH$.

De los grupos presentes en la superficie de las partículas de látex con funcionalidad carboxilo, los grupos sulfato (SO_4^-), provenientes de restos del iniciador y los grupos carboxilo ($COOH$) provenientes del monómero de funcionalización, son grupos iónicos cargados, causantes de generar la densidad de carga superficial a los coloides

poliméricos, y pueden determinarse mediante una valoración directa con una solución de NaOH de concentración conocida.

En el caso de los látex con funcionalidad acetal, para poder determinar la cantidad de estos grupos funcionales superficiales, hay que realizar un método de valoración indirecto: en primer lugar, los grupos acetal se deben transformar en grupos aldehído acidificando el medio mediante la adición de una disolución de HCl de concentración conocida. Posteriormente, los grupos aldehído se determinan mediante una valoración, con una disolución de NaOH, del HCl desprendido en la reacción de dichos grupos aldehído con clorhidrato de hidroxilamina.

Otra de las características fundamentales de los látex es su estabilidad del sistema coloidal, es decir, la capacidad de las partículas a permanecer como entidades aisladas en el medio que las rodea durante largos períodos de tiempo. En general, las partículas coloidales dispersas en un líquido, habitualmente agua, están continuamente colisionando como consecuencia del movimiento Browniano. Cuando las partículas colisionan y se asocian formando agregados, debido a interacciones atractivas de Van der Waals, se dice que el látex es inestable.

Un aumento de temperatura provoca un aumento de la cinética de las microesferas en suspensión, lo cual aumenta la probabilidad de que entren en contacto y se traduce en una mayor probabilidad de interacciones hidrofóbicas. Del mismo modo si la concentración de las microesferas en la suspensión aumenta, también lo hace la probabilidad de colisiones y de interacciones hidrofóbicas.

Para asegurar la estabilidad coloidal del látex, deben existir fuerzas repulsivas que contrarresten y superen a las fuerzas atractivas entre las partículas durante la colisión. La repulsión se genera principalmente por la densidad de carga superficial, debida a las cargas eléctricas que se incorporan en la superficie de la partícula

(estabilización electrostática) y a la presencia de ciertas cadenas de oligómeros adsorbidas o ancladas sobre la superficie (estabilización estérica).

La estabilización electrostática puede ser proporcionada durante la síntesis del látex, utilizando iniciadores cuya descomposición genere cargas iónicas (sales de persulfato, azo-derivados) y comonómeros iónicamente cargados, aumentando significativamente, en ambos casos, la densidad de carga superficial. La estabilización estérica es alternativa y, a menudo impartida debido a la utilización de emulsificantes, surfactantes reactivos, monómeros solubles en agua o especies macromoleculares (polímeros solubles en agua, agentes bloqueantes o copolímeros de injerto).

La *estabilidad coloidal* generalmente se determina midiendo la concentración crítica de coagulación (*c.c.c.*), que es la concentración de electrolito a la cual se produce la agregación de las partículas de látex. La forma más sencilla para determinarla es mediante la observación visual. Sin embargo, para conseguir una mayor objetividad y aumentar la sensibilidad de la medición, se utilizan métodos instrumentales basados en mediciones de dispersión de luz (dispersión de luz dinámica, turbidimetría y nefelometría).

Los factores que influyen directamente en la *c.c.c.* son: la naturaleza de los grupos superficiales de las partículas poliméricas, su densidad de carga superficial, el pH y la fuerza iónica del medio en donde se encuentran, y el tipo de electrolito. La naturaleza de los grupos superficiales y la densidad de carga superficial son características propias de las partículas de látex. Dependiendo del pH del medio en el que se encuentran dispersas las partículas poliméricas y de la naturaleza de sus grupos funcionales superficiales, puede variar la densidad de carga superficial, afectando la estabilidad coloidal. Sin embargo, la fuerza iónica del medio es el factor más importante que afecta a la estabilidad coloidal, ya que las partículas generalmente presentan cadenas oligoméricas, adsorbidas o ancladas sobre la superficie, provenientes del iniciador o de los monómeros. Con una baja fuerza

iónica, estas cadenas se encuentran extendidas hacia la disolución por la repulsión electrostática que existe entre ellas, entonces el tamaño hidrodinámico de la partícula de látex será máximo. Al aumentar la fuerza iónica, la repulsión electrostática entre los grupos iónicos disminuye como consecuencia del apantallamiento producido por los contraiones, generando el colapso de las cadenas sobre la superficie de la partícula, lo que disminuye el tamaño hidrodinámico de la partícula. Sin embargo, el espesor de la capa de moléculas ancladas sobre la superficie no sólo varía con la fuerza iónica del medio, sino que también se observa una dependencia del diámetro hidrodinámico con el pH.

1.4. SINTESIS DE LAS PROTEINAS UTILIZADAS

La búsqueda de Ac en el suero contra componentes del *T. cruzi* ha sido uno de los más importantes pilares del diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. La mayoría de los métodos serológicos están basados en el uso de proteínas del extracto completo del *T. cruzi* (Saez-Alquezar *et al.*, 2000) obtenidas a partir de cultivos *in vitro* del parásito, tras procesarlos por distintas técnicas fisicoquímicas. Como consecuencia, aparecen dificultades para estandarizar la metodología, existe considerable variación en la reproducibilidad y exactitud de los resultados obtenidos, y frecuentemente se observan falsos positivos como producto de la reacción cruzada con otras enfermedades parasitarias, tales como infecciones con *Leishmania* o *T. rangeli* (Cattand y De Raadt, 1991; Levitus *et al.*, 1991; Freilij *et al.*, 1995; Soto *et al.*, 1996). Esta situación, atribuida a una falta de conocimiento acerca de la composición de los Ag utilizados, así como también a la inmunogenicidad del *T. cruzi* en humanos (Stolf, 1987), representa un gasto enorme de muestras y recursos, lo cual podría evitarse si se realiza un ensayo certero sobre las muestras (Carvalho *et al.*, 1993).

Como alternativa, los Ag recombinantes del *T. cruzi* constituyen una herramienta valiosa para su uso como elemento de reconocimiento en los métodos

serológicos para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas, ya que pueden ser producidos en grandes cantidades, con alta pureza y calidad estandarizada (da Silveira, 2001), y eliminan los problemas de reacciones cruzadas, que originan falsos positivos.

La sustitución de los Ag nativos por Ag recombinantes del *T. cruzi* en inmunoensayos además de tener ventajas en términos de la definición química de los Ag (Carvalho *et al.*, 1993) y del costo de producción, podría resolver el problema de la especificidad manteniendo una alta sensibilidad (Frasch y Reyes, 1990; Moncayo, 1999; Levin *et al.*, 1991; Tanowitz *et al.*, 1992).

Se han utilizado muchas proteínas recombinantes para el diagnóstico específico de la Enfermedad de Chagas (Engmen *et al.*, 1989; Cotrim *et al.*, 1990; Frasch y Reyes; 1990; Levin *et al.*, 1991; Burns *et al.*, 1992, Krieeger *et al.*, 1992; Gruber y Zingales 1993; Carvalho *et al.*, 1993; Tibbetts *et al.*, 1994; Godsel *et al.*, 1995; Lorca *et al.*, 1995; Krautz *et al.*, 1998; Umezawa *et al.*, 1999; Saez-Alquezar *et al.*, 2000; da Silveira *et al.*, 2001; Da Rocha *et al.*, 2002; Umezawa *et al.*, 2003; Umezawa *et al.*, 2004; Goto *et al.*, 2008). Sin embargo, ninguna de ellas fueron Ag capaces de ser reconocidos por todos los sueros humanos chagásicos. Para solucionar este inconveniente, se ha recurrido al uso de proteínas quiméricas, que expresan varios determinantes antigénicos no relacionados a fin de mejorar la sensibilidad y la estandarización del proceso, reduciendo los pasos de purificación e inmovilización (Houghton *et al.*, 1999; Houghton *et al.*, 2000; da Silveira *et al.*, 2001; Marcipar *et al.*, 2004; Marcipar *et al.*, 2005; Aguirre *et al.*, 2006; Camussone *et al.*, 2009).

La estrategia utilizada se basa en la elección de epitopes inmunodominantes dentro de los Ag enteros y su posterior ensamblaje, lo que permite contemplar la sensibilidad de ambas moléculas sin perder la especificidad que brindan los fragmentos. Esta estrategia, es una herramienta poderosa para la síntesis de proteínas quiméricas a ser

usadas en el diseño de pruebas de diagnóstico.

1.4.1. Generalidades de la Enfermedad de Chagas

En 1909 Carlos Chagas publicó en Brasil un artículo en el cual describía una nueva enfermedad, su agente causal, la existencia de un vector invertebrado y la transmisión experimental a mamíferos (Chagas, 1909). En la Argentina, la Enfermedad de Chagas fue estudiada principalmente por el Dr. Salvador Mazza (1886-1946), trabajador infatigable, quien mostró su gran importancia sanitaria, describió formas clínicas y difundió sus análisis.

La Enfermedad o Mal de Chagas (también conocida como Tripanosomiasis Americana) es una afección parasitaria hemática e hística causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, que se desarrolla como una infección de por vida en humanos y se caracteriza por presentar una corta fase aguda con alta parasitemia, que no es diagnosticada en muchos casos, y una subsecuente fase crónica que es persistente.

El ciclo de vida del parásito es complejo, lo que maximiza el potencial de transmisión y/o la evasión del sistema inmune del hospedero y, como consecuencia, la sobrevivencia a largo plazo del parásito (Tyler *et al.*, 2001).

En el triatomino (vinchuca), el ciclo se inicia cuando el insecto pica a un huésped infectado; de este modo, algunos tripomastigotes pasan a él a través de la sangre. En el intestino del insecto, se transforman en epimastigotes, los cuales constituyen una segunda etapa reproductiva. Después de la reproducción, los epimastigotes pasan al recto. Allí se convierten en tripomastigotes metacíclicos y se evacúan a través de las heces. Las heces pueden infectar a un nuevo huésped, repitiéndose el ciclo (Fig. 1.9).

En el ser humano, el ciclo se inicia cuando el triatomino infectado pica y

defeca. Los tripomastigotes metacíclicos se transmiten en las heces que penetran en el huésped a través de la herida o por el cruce de las membranas mucosas. Cuando entran en una célula humana, se convierten en amastigotes. Esta es una etapa reproductiva que genera una gran cantidad de amastigotes dentro de la célula infectada. El amastigote se convierte de nuevo en tripomastigote; la célula se rompe y el tripomastigote vuelve a infectar otra célula repitiéndose el ciclo de multiplicación.

La transmisión transfusional se considera el segundo mecanismo de infección en zonas endémicas y el principal mecanismo en zonas libres de vector; esto es debido al incremento en la migración poblacional, sobre todo desde zonas endémicas hacia zonas no endémicas (Bettencourt, 1976; Mendes *et al.*, 1997).

Existen otras vías de transmisión, de menor frecuencia, como la congénita, a través del transplante de órganos y de la leche materna; o por accidentes en laboratorio.

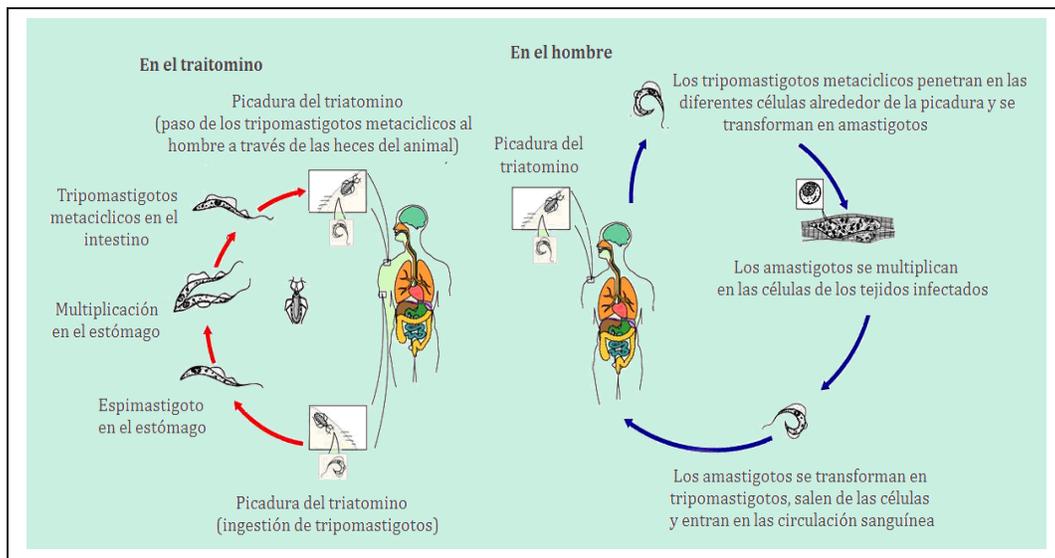


Figura 1.9. Ciclo de vida del *T. cruzi* en el triatomino y en el hombre.

1.4.1.1. Diagnóstico

La prevención y el diagnóstico son las principales armas para controlar la

Enfermedad de Chagas.

El diagnóstico, se basa en el uso integrado de tres herramientas importantes, que son: clínica, epidemiología y laboratorio. Los exámenes a realizar en el laboratorio dependerán de la etapa clínica que curse el paciente. En la etapa inicial de la enfermedad se encuentran parasitemias importantes, por lo que el estudio se basa en la búsqueda del *T. cruzi* en sangre (Aznar *et al.*, 1995). En las etapas latente y crónica las parasitemias son transitorias, por lo que la detección del parásito es muy difícil (Who, 1974; Andrade, 1985; Van Meirvene y Le Ray, 1985; Pessoa y Vianna, 1974; Rodrigues, 1985). El diagnóstico se confirma por la demostración de los Ac contra *T. cruzi* en el suero mediante técnicas como ELISA, IFI, HAI, o aglutinación de partículas.

Ninguno de los métodos es totalmente confiable por lo que la Organización Mundial de la Salud y el Instituto Nacional de Parasitología "Doctor Mario Fatale Chabén" recomiendan el uso de por lo menos dos técnicas complementarias, basadas en diferentes metodologías o diferentes preparaciones antigénicas, para identificar a un paciente como chagásico. En caso de disparidad se usa una tercera reacción para definir el estado de infectado.

La composición antigénica del *T. cruzi* es compleja y muchos de sus componentes forman parte de la interacción del protozoario con el medio. Durante todo el proceso de morfogénesis, suceden cambios dinámicos en las estructuras de superficie del parásito y por lo tanto en su genotipo. Desde el punto de vista antigénico se han observado diferencias en todos los estadios como así también antígenos comunes entre ellos (De Lima *et al.*, 2007). En consecuencia, la mayoría de los ensayos serológicos que se basan en la detección de Ac en contra de proteínas totales del *T. cruzi* (Ag obtenidos de la lisis de epimastigotes o tripomastigotes) pueden presentar falsos negativos y falsos positivos, especialmente en pacientes con leishmaniasis. Además, las condiciones de cultivo de

parásitos y purificación de antígenos son difíciles de estandarizar, por lo que llevan a resultados variables entre lotes (Kloetzel *et al.*, 1975; Schechter y Nogueira, 1988; Contreras *et al.*, 1994; Saldana y Souza, 1996; Vexenat *et al.*, 1996; Araque *et al.*, 1996; Sáez-Alquezar *et al.*, 1997; Contreras *et al.*, 1998; Bucio *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2001).

Sin embargo, se han reportado un número considerable de secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) codificantes de proteínas presentes en las distintas cepas del parásito que son específicamente reconocidas por sueros de pacientes infectados con *T. cruzi* de diferentes regiones geográficas y que están relacionados con un estadio particular o forma clínica de la enfermedad.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, la utilización de material parasitario definido, ya sea natural o recombinante, es claramente un requisito para mejorar el serodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas, permitiendo al mismo tiempo un aumento de la especificidad de las reacciones utilizadas.

En cuanto a la utilización de Ag purificados del parásito, su producción y purificación a gran escala, por los métodos extractivos clásicos, es muy difícil y consume mucho tiempo, y sólo se consiguen pequeñas cantidades de componentes antigénicos, lo que dificulta la producción de reactivos a nivel industrial (Solana *et al.*, 1995; Marcipar *et al.*, 2003).

La aplicación de la tecnología del ADN recombinante, ha permitido superar estos inconvenientes (Umezawa *et al.*, 1999; Silveira *et al.*, 2001; Umezawa *et al.*, 2003).

1.4.2. Tecnología del ADN Recombinante

La tecnología de ADN recombinante es el conjunto de técnicas que permiten aislar un gen de un organismo, para su posterior manipulación e inserción en otro

diferente, dando origen a una molécula de ADN recombinante. De esta manera, podemos hacer que un organismo (animal, vegetal, bacteria, hongo) o un virus sintetice una proteína que le sea totalmente extraña, denominada proteína heteróloga o recombinante.

La primera molécula de ADN recombinante fue creada por Paul Berg, a comienzos de los 70. Otros pioneros de esta tecnología fueron Stanley Cohen, un genetista estadounidense, y Herbert Boyer, un bioquímico de la misma nacionalidad. Para aquella época, los biólogos moleculares habían aprendido a alterar genes individuales, cortar y pegar pedazos de ADN de diferentes organismos y moverlos de uno a otro.

En la actualidad, si bien, la expresión de genes heterólogos se ha producido en células de mamíferos, insectos y levaduras, la bacteria *Escherichia coli* continúa siendo el microorganismo más empleado debido a que se multiplica muy rápidamente y puede expresar proteínas heterólogas rutinariamente con niveles superiores al 15% del total de proteínas celulares producidas en esta bacteria, por lo que es posible lograr una sobreproducción de la proteína deseada en un corto período de tiempo.

Los pasos fundamentales en la tecnología de ADN recombinante, mostrados en la Fig. 1. 10, se pueden resumir en cuatro (Sambrook *et al.*, 1989; Alberts *et al.*, 1996; Izquierdo Rojo 2001, Snyder *et al.*, 2003):

Paso 1: El ADN del organismo que contiene el gen deseado se corta en segmentos más pequeños utilizando enzimas de restricción. Estas enzimas fueron descubiertas en 1975 por los microbiólogos Daniel Nathans y Hamilton O. Smith, y se caracterizan por su habilidad para cortar ADN sólo en secuencias bien específicas (secuencias de reconocimiento), generando una mezcla de fragmentos de ADN con extremos romos (extremos de doble cadena) o cohesivos (con extremos de simple cadena complementarios entre sí) que pueden unirse con cualquier otro extremo producido por la misma enzima de restricción.

Paso 2: Las piezas de ADN se unen a un vector generando una molécula de ADN recombinante.

Los vectores más comúnmente usados son los plásmidos, que son moléculas de ADN extracromosomal con capacidad de replicación autónoma que codifican uno o más genes. Dentro de ellos, algunos pueden conceder resistencia a antibióticos

Para preparar el plásmido como vector, éste debe ser cortado con la misma enzima de restricción con la que se cortó el ADN del gen deseado, de modo que los extremos del plásmido y los del ADN a insertar sean complementarios y puedan unirse cuando son mezclados y tratados con la enzima ADN ligasa. De esta manera, se genera una molécula que consiste de dos clases de ADN conectados uno a otro en un anillo molecular sencillo.

Paso 3: Las moléculas recombinantes se introducen en la célula huésped.

Una vez que los biólogos encontraron cómo fabricar ADN recombinante usando enzimas de restricción y ligasas, el desafío siguiente fue cómo producir grandes cantidades de genes y cómo introducirlos en bacterias u otras células huésped.

En un proceso llamado transformación, el plásmido recombinado de ADN se introduce en la célula huésped que actúa como una copiadora biológica, pues, durante la división celular, al menos una copia del ADN plasmídico es segregada a cada célula hija, asegurando una propagación continua del plásmido a través de sucesivas generaciones de la célula huésped. Sin embargo, solamente algunas células huéspedes son transformadas; es decir, que solamente algunas células huéspedes contienen el gen de interés.

Una forma de identificar las bacterias que contienen los plásmidos, es utilizando plásmidos que transporten genes resistentes a antibióticos. Cuando estas bacterias son colocadas en un medio nutriente sólido conteniendo el antibiótico, la

bacteria que adquirió el plásmido recombinado crecerá en colonias. Cada colonia es llamada un clon.

Paso 4: La colonia de células que contiene el gen de interés es separada de la genoteca resultante para su producción y purificación.

A partir de las colonias se hace un cultivo en medio líquido para amplificar la cantidad de células que contienen el gen de interés.

El primer paso en el aislamiento de una proteína es la rotura celular, para posteriormente poder extraer la proteína con un tampón adecuado. El resultado de todos estos tratamientos es un lisado u homogenato que contiene una mezcla de enzimas, membranas y células rotas. Esta preparación se somete a centrifugación para eliminar los restos celulares y separar el sobrenadante, que contiene las proteínas solubles, del precipitado. La fase soluble constituye el extracto crudo donde se encuentra la proteína de interés objeto de la purificación.

Para purificar una proteína es deseable que este método sea específico y fácil de llevar a cabo. Uno de los métodos más habitualmente utilizados para la separación de proteínas es la cromatografía en columna.

La columna está rellena con un material sólido (fase estacionaria), y la solución que contiene la proteína de interés (fase móvil) se hace pasar a través de la misma usando una bomba peristáltica. Una vez que toda la muestra atravesó la columna y que la proteína de interés quedó retenida se procede a su elución. Un colector de fracciones va recogiendo el eluyente. Para comprobar si la proteína de interés se ha separado del resto, es decir si la proteína está pura, se requiere de técnicas electroforéticas. La electroforesis de proteínas se lleva a cabo generalmente en geles de poliacrilamida.

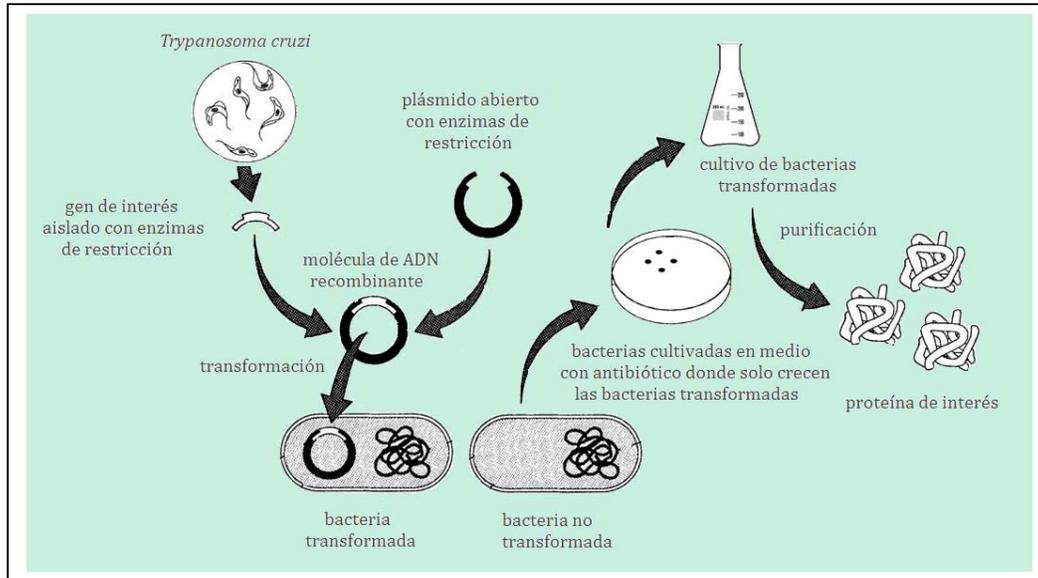


Figura 1.10. Pasos en la tecnología del ADN recombinante.

1.4.2.1. Ventajas del Uso de Proteínas Recombinantes

Cuando se utiliza una mezcla compleja de Ag, donde una gran parte son Ag indefinidos, no sólo aparecen problemas de especificidad, sino también dificultades para estandarizar la metodología.

Las proteínas recombinantes además de que pueden ser obtenidas en grandes cantidades y de forma altamente purificada, pueden ser sintetizadas a partir de secuencias de ADN diseñadas para codificar fragmentos peptídicos altamente antigénicos, lo cual permite mejorar el rendimiento de la prueba en comparación con la mezcla antigénica.

La sustitución de los Ag nativos por Ag recombinantes del *T. cruzi* en inmunoensayos constituye una herramienta valiosa para su uso como elemento de reconocimiento en los métodos serológicos para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.

Los Ag recombinantes además de tener ventajas en términos de su definición

química (Carvalho *et al.*, 1993), lo que permite estandarizar la metodología, y del costo de producción, resuelven el problema de la especificidad, eliminando la probabilidad de tener resultados falsos positivos por reacción cruzada con protozoarios relacionados, tales como infecciones con *Leishmania* o *T. rangeli* y manteniendo una alta sensibilidad (Frasch *et al.*, 1990, Moncayo, 1999; Levin *et al.*, 1991; Tanowitz *et al.*, 1992).

Se ha reportado un número considerable de secuencias de ADN codificantes de proteínas que son específicamente reconocidas por sueros de pacientes infectados con *T. cruzi*. En muchos casos estas proteínas han sido evaluadas en ensayos de diagnóstico (Engmen *et al.*, 1989; Cotrim *et al.*, 1990; Frascch y Reyes, 1990; Levin *et al.*, 1991; Burns *et al.*, 1992, Krieeger *et al.*, 1992; Carvalho *et al.*, 1993; Gruber y Zingalles, 1993; Tibbetts *et al.*, 1994; Godsel *et al.*, 1995; Lorca *et al.*, 1995; Krautz *et al.*, 1998; Umezawa *et al.*, 1999; Saez-Alquezar *et al.*, 2000; da Silveira *et al.*, 2001; Da Rocha *et al.*, 2002; Umezawa *et al.*, 2003; Umezawa *et al.*, 2004; Goto *et al.*, 2008). Sin embargo, ninguna de ellas fueron Ag capaces de ser reconocidos por todos los sueros humanos chagásicos.

Teniendo en cuenta la pérdida de sensibilidad cuando se utiliza un solo péptido recombinante, respecto a la mezcla de Ag nativos, surgen dos alternativas: el empleo de una mezcla de péptidos recombinantes, o el uso de las proteínas multiepitope (proteínas quiméricas) que expresan varios determinantes antigénicos no relacionados.

La mezcla de péptidos puede disminuir la antigenicidad individual de los Ag una vez adsorbidos en fase sólida, debido a la obstrucción de los sitios antigénicos. Además, péptidos antigénicos presentes en la mezcla pueden competir por los sitios de unión, lo que lleva a una disminución de sensibilidad.

Para solucionar este inconveniente, se ha recurrido al uso de proteínas quiméricas, a fin de mejorar la sensibilidad y la estandarización del proceso, reduciendo

los pasos de purificación e inmovilización (Houghton *et al.*, 1999; Houghton *et al.*, 2000; da Silveira *et al.*, 2001; Marcipar *et al.*, 2004; Marcipar *et al.*, 2005; Aguirre *et al.*, 2006; Camussone *et al.*, 2009).

De hecho, para producir quimeras se requiere la purificación de una sola proteína, lo que disminuye considerablemente los costos de producción en comparación a lo que resulta cuando varias proteínas deben ser purificadas. Además, la normalización del método se ve facilitada ya que se iguala el número de epitopes que participan en el inmunoensayo y se reducen los pasos de inmovilización.

Cuando la sensibilización se realiza con construcciones quiméricas, la proteína puede unirse a la fase sólida a través de algunos sitios antigénicos, dejando el resto de la molécula disponible para reaccionar libremente. Por lo tanto, aún cuando un epitope sea bloqueado, otros epitopes todavía quedan expuestos para interactuar con uno de sus Ac, lo que mejora la sensibilidad de la prueba. Por otro lado, el uso de proteínas multiepitope permite obtener un mejor control del pegado de los Ag a la fase sólida, facilitando la estandarización en la producción de los reactivos.

1.5. SENSIBILIZACIÓN DE LAS PARTICULAS DE LATEX

Una vez sintetizados y caracterizados los látex funcionalizados que servirán como base para los inmunoensayos, el paso siguiente es la sensibilización de las partículas con las proteínas de interés. Este procedimiento puede realizarse por simple adsorción física, donde intervienen principalmente interacciones hidrofóbicas; o por unión covalente, en la cual los grupos funcionales de las partículas reaccionan con los grupos presentes en las proteínas.

Singer y Plotz (1956) fueron los pioneros en la unión de proteínas en la superficie de partículas de coloides poliméricos, adsorbiéndolas físicamente sobre

partículas de poliestireno. Sin embargo, la primera información sobre la aplicación de microesferas de polímero como “carriers” de proteínas adsorbidas físicamente y el desarrollo de reactivos de diagnóstico ocurrió al menos 10 años más tarde (Bolin *et al.*, 1968; Hipp *et al.*, 1970; Smith y Ts’ao, 1973; Heymer *et al.*, 1973; Horwitz *et al.*, 1973; Bird *et al.*, 1977).

Cerisola *et al.* (1980) estudiaron la reacción de aglutinación de partículas de látex para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Para ello, utilizaron partículas de PS sensibilizadas mediante adsorción física con los Ag presentes en el sobrenadante de la lisis del parásito. La detección de la reacción de aglutinación se realizó visualmente.

En la actualidad, la mayoría de las investigaciones dedicadas al inmunodiagnóstico se centran en la obtención de complejos látex-proteína mediante unión covalente. Para conseguir este tipo de unión, es necesario sintetizar partículas de látex con una funcionalidad superficial tal que pueda reaccionar eficazmente con las proteínas.

En esta Tesis se trabajó con partículas de látex con funcionalidad carboxilo y acetal como soportes poliméricos para llevar a cabo la unión covalente de distintas proteínas antigénicas. Los grupos carboxilos no reaccionan espontáneamente, y necesitan ser activados mediante el método de la carbodiimida. Los grupos acetal se transforman en grupos aldehídos mediante una simple acidificación, y estos últimos pueden unirse covalentemente con las proteínas sin activación previa.

1.5.1. Estructura de las Proteínas

Las proteínas constituyen el componente orgánico fundamental del ser vivo y son las biomoléculas más versátiles y más diversas. Son imprescindibles para el crecimiento del organismo y realizan una enorme cantidad de funciones diferentes, desde las meramente estructurales hasta las más variadas actividades, como pueden ser: la

enzimática, regulando procesos metabólicos, transportando sustancias a través del plasma, y de defensa, ya que los Ag y Ac que intervienen en los fenómenos inmunológicos son proteínas.

Las proteínas son macromoléculas formadas por la combinación de tan solo 20 α -aminoácidos diferentes que se unen mediante enlaces peptídicos. Un α -aminoácido, es una molécula orgánica formada por un grupo amino ($-\text{NH}_2$) conectado a un átomo de carbono α de un grupo carboxílico ($-\text{COOH}$). En posición α también se encuentran un átomo de hidrógeno y un grupo lateral (Fig.1.11).

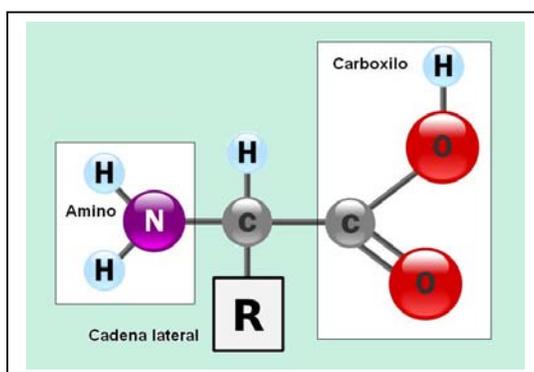


Figura 1. 11. Estructura general de un aminoácido.

La obtención de los diferentes α -aminoácidos depende de la composición química del grupo lateral R. En general, el grupo lateral, puede ser una cadena lineal o cíclica con diferente grado de polaridad e incluso puede contener un anillo aromático y grupos carboxilo o amino adicionales. Todas las proteínas tienen carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, y casi todas poseen también azufre.

Dos aminoácidos se unen mediante enlaces covalentes en una reacción de condensación formando un enlace peptídico entre el grupo carboxilo y el grupo amino de residuos de aminoácidos adyacentes y liberando agua. El ordenamiento o la secuencia de aminoácidos que forman la cadena polipeptídica se denomina estructura primaria. Esta

estructura es altamente específica para cada proteína, al punto que un cambio de orden o sustitución de un único aminoácido, altera la función de la molécula.

El ordenamiento periódico y regular que adoptan algunas secciones de la cadena en el espacio a lo largo de una dirección se denomina estructura secundaria, mientras que la estructura terciaria se relaciona con la forma de plegamiento de los segmentos de la cadena polipeptídica que da lugar a una estructura más compacta. Por último, la estructura cuaternaria se genera por asociación mediante interacciones débiles entre dos o más cadenas polipeptídicas (Fig. 1.12).

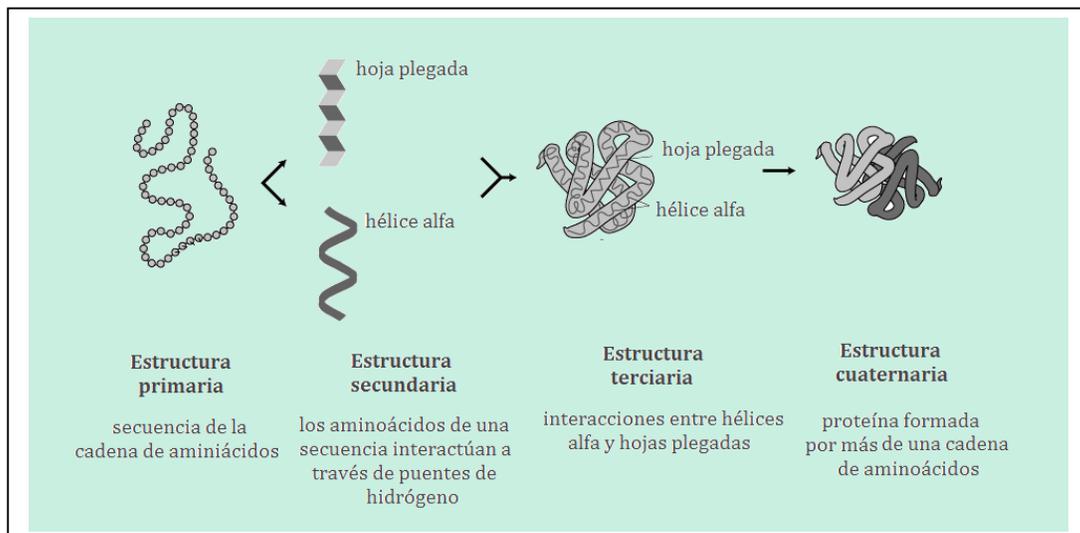


Figura 1.12. Estructuras de una proteína.

La conformación o estructura de una proteína en su estado natural, en el cual realiza su función biológica, se denomina conformación o estructura nativa. Pequeñas variaciones en la temperatura, pH, o estructura nativa de la proteína, pueden hacer que ésta deje de ser funcionalmente activa en un proceso denominado desnaturalización. Si durante la desnaturalización no se produce la ruptura de la cadena peptídica, la proteína puede llegar a recuperar la conformación nativa en un proceso denominado renaturalización.

La propiedad más interesante de los aminoácidos es la dependencia de su estado de ionización con el pH del medio en el que se encuentran disueltos. El pH en el cual el aminoácido se encuentra en una forma eléctricamente neutra se conoce como punto isoeléctrico (pI). Los aminoácidos a un pH por debajo de su pI se encuentran mayoritariamente en su forma catiónica (con carga positiva), mientras que a un pH más alto de su pI se encuentran en su forma aniónica (con carga negativa).

1.5.2. Métodos Colorimétricos Utilizados para la Cuantificación de Proteínas

Determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica es un requerimiento de rutina básico cuando se aborda un esquema de purificación de una proteína concreta, y se quiere conocer la actividad específica de una muestra, para el diagnóstico de enfermedades, así como para otros propósitos. En la actualidad, existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas; muchos de éstos se basan en la capacidad que tienen las proteínas de unirse a ciertos colorantes. En lo que sigue, se presenta una descripción general de los principales métodos colorimétricos utilizados para la cuantificación de proteínas.

1.5.2.1. Método de Biuret

Se basa en la formación de un complejo de cobre tetradentado de color azul claro entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos de la proteína en medio básico. La intensidad de la coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteína (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren. Sin embargo, la sensibilidad del método es muy baja y sólo se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados muy concentrados (Fig. 1.13).

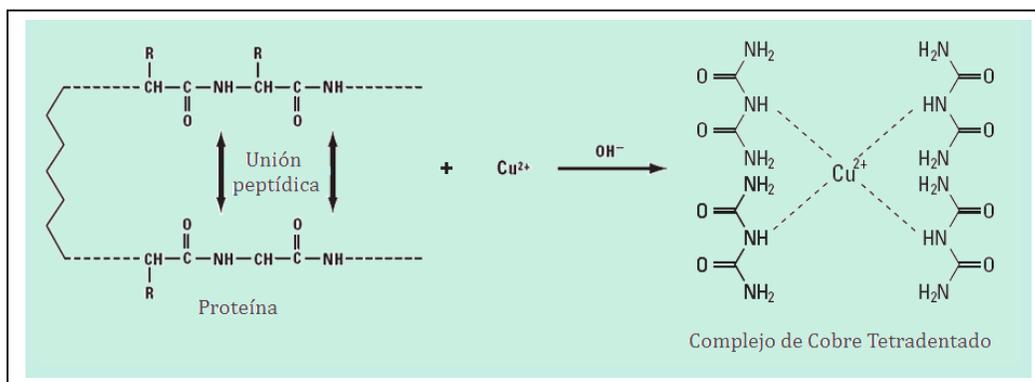


Figura 1.13. Reacción que tiene lugar durante la cuantificación de proteínas mediante el Método de Biuret.

1.5.2.2. Método de Bradford

El uso del colorante Coomassie G-250 en un reactivo colorimétrico para la detección y cuantificación de proteínas totales fue descrito por primera vez por Marion Dr. Bradford en 1976. El método se basa en la unión del colorante a las proteínas para formar un complejo proteína- Coomassie G-250 con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre (Fig. 1.14). La cantidad de colorante unido a la molécula de proteína es proporcional al número de cargas positivas de la misma y el desarrollo del color está asociado a la presencia de ciertos aminoácidos básicos; principalmente arginina, lisina e histidina.

En general, la masa de un péptido o proteína debe ser de al menos 3 kDa para poder utilizar este método y debido a que el Coomassie G-250 es muy ácido, un pequeño número de proteínas no pueden ser analizadas con este reactivo debido a su baja solubilidad en él. Este método es sensible (1-15 μg), simple, rápido, barato y compatible con la mayoría de las sales, solventes, tampones, tioles, agentes reductores y quelantes, pero es incompatible con los surfactantes debido a que la presencia de los mismo en la muestra, incluso a bajas concentraciones, causa la precipitación de los reactivos.

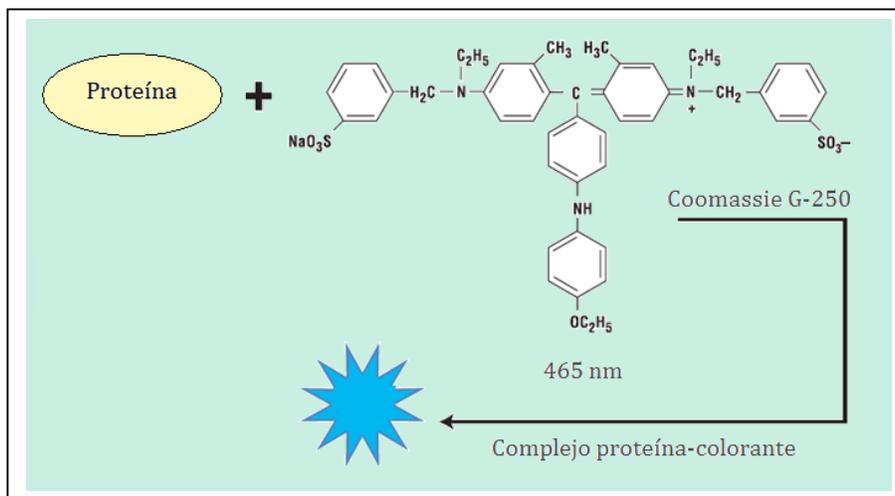


Figura 1.14. Reacción que tiene lugar durante la cuantificación de proteínas mediante el Método de Bradford.

1.5.2.3. Método del Acido Bicinconínico (BCA)

Smith *et al.* (1985), introdujeron el ensayo de BCA. Desde entonces se ha convertido en el método colorimétrico más popular para la detección y cuantificación de proteínas totales.

El ácido bicinconínico, es una sal sódica capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} en medio alcalino. El primer paso del método colorimétrico es la quelación del Cu^{2+} con la proteína en un medio alcalino para formar un complejo de color azul (Fig. 1.15). En el segundo paso, el reactivo BCA reacciona con el catión Cu^{1+} que se formó previamente para dar un producto de color morado, que se genera por la quelación de dos moléculas de BCA con un Cu^{1+} . El complejo BCA/ Cu^{1+} es soluble en agua y presenta una fuerte absorción a 562 nm, la cual aumenta linealmente con la concentración de proteína.

En general, el ensayo de BCA proporciona una de las medidas más exactas de la concentración de proteínas en muestras biológicas; es compatible con muestras que contienen hasta un 5% de detergentes; es sencillo, rápido, y fácil de realizar.

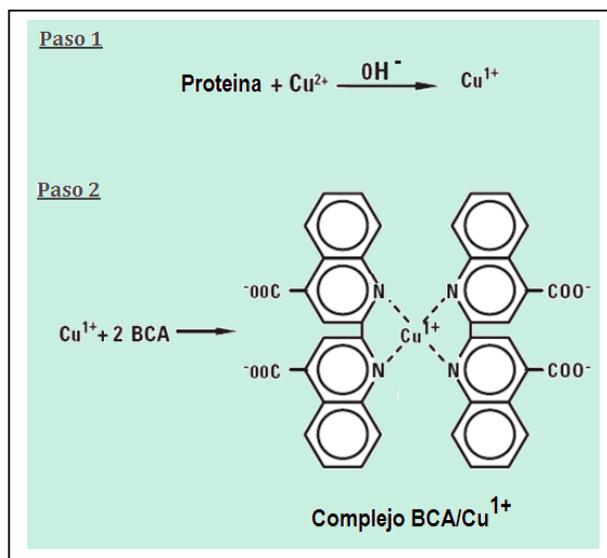


Figura 1.15. Reacción que tiene lugar durante la cuantificación de proteínas mediante el Método de BCA.

En la Tabla 1.1. se comparan los distintos métodos colorimétricos utilizados para la cuantificación de proteínas, analizando las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

Tabla 1.1. Principales métodos colorimétricos para la cuantificación de proteínas.

Método	Ventajas	Desventajas
Buuret	<ul style="list-style-type: none"> • Bastante específico • Pocas interferencias • Barato 	<ul style="list-style-type: none"> • Poca sensibilidad
Bradford	<ul style="list-style-type: none"> • Muy sensible • Simple • Rápido • Barato 	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra interferencia con detergentes • La masa de la proteína debe ser ≥ 3 kDa
BCA	<ul style="list-style-type: none"> • Método mas sensible • Pocas interferencias • Fácil de realizar • Rápido 	<ul style="list-style-type: none"> • Muestra algunas interferencias

1.5.3. Interacción Látex-Proteína

Muchas investigaciones se han dedicado al diseño y preparación de coloides poliméricos con propiedades adecuadas, capaces de interactuar con macromoléculas

biológicamente activas, sin afectar significativamente el comportamiento de los dos componentes, es decir, la estabilidad coloidal en el caso de las partículas y la actividad biológica en el caso de las biomoléculas.

Las partículas de látex pueden ser sensibilizadas (recubiertas) por proteínas, tales como Ag, Ac y péptidos, para ser utilizadas con propósitos de diagnóstico.

Estrictamente hablando, la sensibilización de una superficie es la acumulación de moléculas de proteínas en la región interfacial. Si esta acumulación resulta de interacciones físicas (electrostáticas, hidrofóbicas, etc.) se denomina adsorción física. En cambio, si se forma un enlace específico entre las moléculas y la superficie, se designa como unión covalente o “adsorción química”.

Una vez que la partícula ha sido sensibilizada, las condiciones del medio que rodea directamente a las proteínas pueden ser muy diferentes al existente en solución libre (efecto microambiental). Por lo tanto, se pueden producir cambios en la actividad, debido a la desnaturalización de la proteína, cambios en la estabilidad, y cambios en sus propiedades cinéticas.

La adsorción física de una proteína es la forma más económica y simple de sensibilización. La misma se realiza simplemente incubando la proteína y las partículas de látex por un tiempo determinado donde se producen interacciones no específicas (electrostáticas, Van der Waals, puentes Hidrógeno) entre ambas.

Una vez que la proteína se encuentra sobre la superficie, puede relajarse para optimizar la interacción proteína-superficie, aumentando el área de contacto y disminuyendo la posibilidad de que otras proteínas que llegan a la superficie encuentren un sitio disponible para la adsorción. Esta relajación normalmente involucra rearrreglos

estructurales o cambios conformacionales en la proteína, que pueden ocasionar una disminución en la actividad biológica debido a que los sitios activos de la molécula pueden verse comprometidos en la interacción con la superficie. Por lo tanto, no es adecuado asumir que todas las proteínas inmovilizadas son activas. Independientemente de la cantidad de proteína inmovilizada, la concentración de proteína activa es la realmente importante, es decir, la cantidad de proteína que se encuentra disponible para reaccionar.

Además, a causa de los débiles enlaces involucrados, las moléculas adsorbidas físicamente pueden ser desorbidas por cambios de temperatura, pH, fuerza iónica, y al volver a la solución, la molécula puede disociarse, reestructurarse y volver al estado nativo, o permanecer en el estado perturbado.

Sin embargo, la principal ventaja de la adsorción física es que no necesita activación previa ni reactivos adicionales. Como resultado, es barata, fácil de llevar a cabo, y tiende a ser menos perjudicial para la proteína.

La unión covalente cuenta con varias ventajas respecto de la adsorción física. Es más fuerte, estable y se puede inducir una orientación preferencial de la proteína sobre la superficie para reducir la posibilidad de cambios conformacionales que afecten su actividad. En consecuencia, se evitan los problemas de relajación, desorción, intercambio con otras moléculas y compromiso de los sitios biológicamente activos con la superficie que presenta la adsorción física.

Sin embargo, para la unión covalente de las proteínas sobre la superficie de las partículas, es necesario que ambas presenten grupos funcionales capaces de interactuar entre si para formar un enlace específico.

La reacción se debe realizar en condiciones tales que los reactivos utilizados no causen la pérdida de la actividad de la proteína y que el sitio activo no se vea afectado;

además el buffer no debe contener compuestos que puedan interferir en la reacción o competir con la proteína. Por ejemplo, buffers acetato reducen la reactividad de carbodiimidas, y por lo tanto no se recomienda su uso cuando la partícula presenta funcionalidad -COOH.

Los látex con funcionalidad carboxilo no son lo suficientemente activos para reaccionar espontáneamente con los grupos amino de las proteínas, y por ello es necesario activarlos previamente con una carbodiimida soluble en agua: la N-N-(3-dimetilaminopropil) N'-etilcarbodiimida (EDC), que convierte los grupos carboxilo en acilureas que reaccionan fácilmente con los grupos amino de las proteínas, con formación de un enlace amida. Como la acilurea se hidroliza con facilidad, es conveniente que la activación se realice en presencia de la proteína (Fig. 1.16).

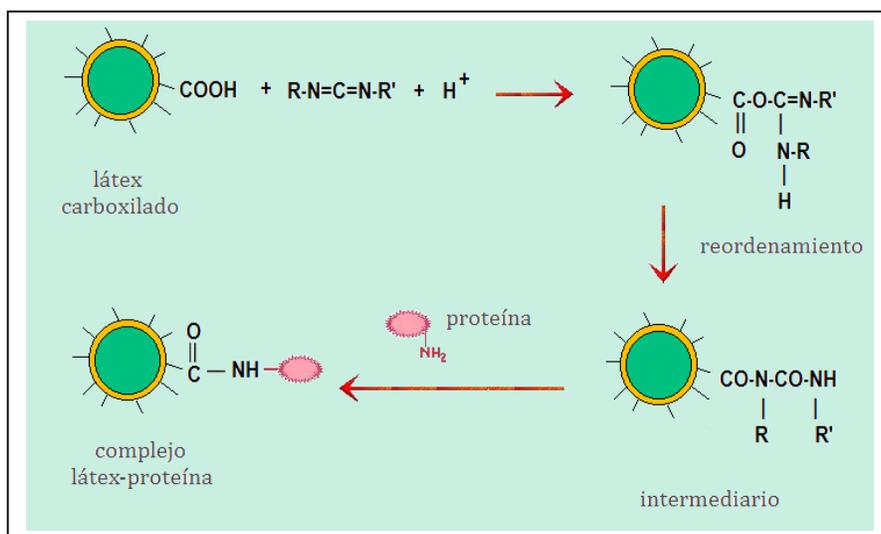


Figura 1.16. Esquema de activación de un látex carboxilado con EDC y posterior reacción con una molécula de proteína.

La cantidad de carbodiimida a utilizar depende de la cantidad de grupos carboxilo presentes en la superficie de las partículas, recomendándose utilizar una cantidad entre 2 y 5 veces superior al equivalente de grupos carboxilo superficiales, para garantizar que estos últimos se transformen en acilurea (Seradyn Technical Bulletin, 1991).

En los látex con funcionalidad acetal, para poder ser sensibilizados mediante unión covalente, se debe realizar la transformación de los grupos acetal en grupos aldehídos mediante una simple acidificación. Los grupos aldehído no precisan de ninguna reacción previa de activación para unirse covalentemente a las proteínas formando iminas. Como las iminas poseen un doble enlace que se hidroliza fácilmente, generando la separación entre la proteína y la superficie del látex, los dobles enlaces se reducen a enlaces simples con un agente reductor.

1.6. APLICACION DE LOS COMPLEJOS LATEX-PROTEINA EN ENSAYOS DE INMUNOAGLUTINACION

La tecnología inmunoquímica se originó alrededor de 1960, cuando Yalow y Berson desarrollaron un ensayo inmunológico cuantitativo que permitía detectar insulina humana a nivel de picogramos (Yalow y Berson, 1959; Yalow y Berson, 1960). A partir de ese momento, esta metodología encontró aplicación en biología, endocrinología y química clínica. Pero no fue hasta finales de los '70, en que Hammock y Mumma, entre otros, resaltaron el potencial de esta tecnología, impulsando su aceptación como metodología analítica (Enguall *et al.*, 1972; Langone *et al.*, 1975; Hammock *et al.*, 1980).

Un inmunoensayo es una prueba que utiliza los complejos obtenidos cuando se unen los Ac y los Ag generando una señal que puede medirse, aprovechando la alta especificidad y afinidad que poseen los Ac para un Ag específico (Voller *et al.*, 1976; Tijssen, 1985; Johnstone *et al.*, 1982; Bloisi, 1988; Harlow *et al.*, 1988; Bullock *et al.*, 1989; Wild, 1994; Lefkovits *et al.*, 1997).

Antígeno es la sustancia que el cuerpo está tratando de combatir, eliminar o reducir durante la respuesta inmunológica. Se pueden diferenciar dos características primordiales en un Ag: la inmunogenicidad o capacidad para generar una respuesta inmune en un organismo dado, y la antigenicidad que hace que éste sea reconocido por un

determinado Ac.

A la región del Ag reconocida por un Ac se la denomina epítopo o determinante antigénico. Un Ag puede presentar un número variable de epítopos de estructura única o repetitiva.

Para que exista una eficiente interacción entre el Ag y el Ac, el epítopo debe estar fácilmente disponible para la unión. Si la molécula blanco es desnaturalizada, por ejemplo, por la fijación o cambios de pH, el epítopo puede ser alterado y esto puede afectar su habilidad para interactuar con un Ac.

Anticuerpo, también conocido como inmunoglobulina (Ig), es una proteína producida por el cuerpo en respuesta a una sustancia “extraña”. Los Ac se producen como parte de la respuesta inmunológica del cuerpo para protegerse. Estos constan de dos regiones principales: la región Fab, que contiene el punto de unión del Ag y que varía entre diferentes Ac; y la región Fc, que posee una estructura constante dentro de una clase de Ac (Fig. 1.17).

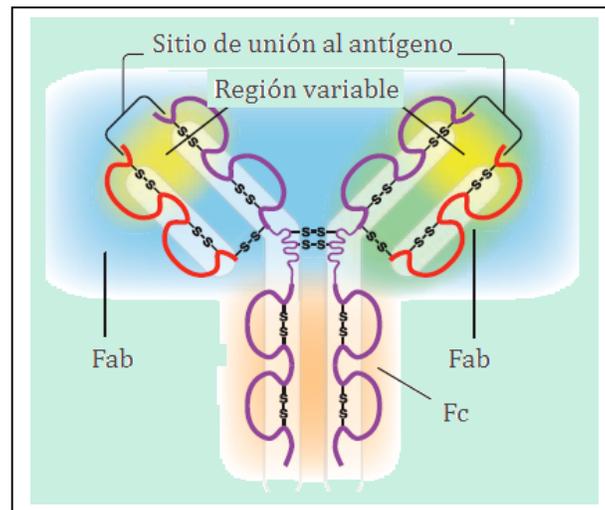


Figura 1.17. Estructura del anticuerpo y puntos funcionales.

El proceso de preparación de un Ac comienza cuando el Ag ingresa al

organismo. A este Ag a veces se lo denomina sustancia inmunógena, debido a que puede estimular una respuesta inmunológica. A partir de la toma de sangre se separa el suero el cual generalmente es rico en Ac que reconocen el Ag.

El suero por lo general contiene una mezcla de Ac que reconocen y se unen al mismo Ag, pero pueden combinarse con diferentes epitopes (Fig. 1-18). A estos Ac, presentes como una mezcla diversa, se los denominan Ac policlonales y pueden variar de un individuo a otro. Por otro lado, a los Ag que contiene múltiples puntos de unión (epitopes) para los diferentes Ac presentes en el suero se los denomina Ag multivalentes.

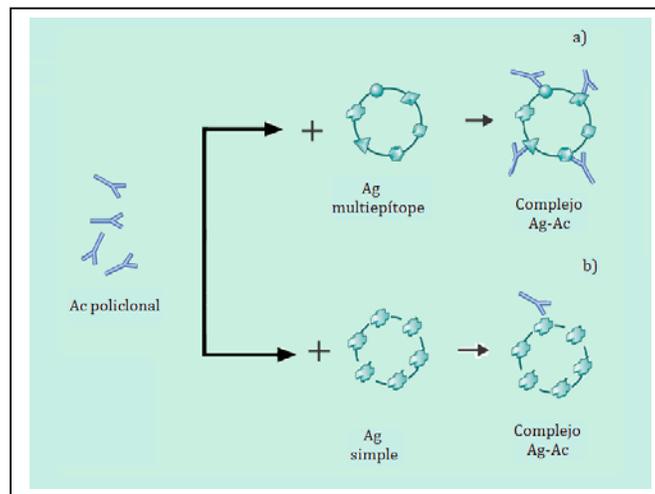


Figura 1.18. Esquema de interacción con un suero policlonal de un Ag: a) multiepitope, b) simple.

La afinidad describe la suma de todas las fuerzas de interacción (atractivas y repulsivas) entre el sitio de unión del Ac (paratope) y el correspondiente epitope presente en el Ag; mientras que la avidéz es la fuerza con la que un Ac se une a un Ag multivalente. Aunque la avidéz depende de las afinidades individuales de cada uno de los determinantes individuales de ese Ag, su valor es mucho mayor que la suma de afinidades.

La reactividad cruzada se refiere a la reacción que se produce cuando un Ac reacciona con un Ag distinto del que le corresponde reconocer específicamente. Esto

puede ser causado ya sea, por la baja avidéz o especificidad del Ac o por múltiples distintos Ag que tienen idénticos o muy similares epitopes.

En cuanto a las técnicas de inmunoensayos, éstas pueden ser homogéneas o heterogéneas. En los inmunoensayos homogéneos, el evento de biorreconocimiento se detecta en solución sin necesidad de separar los reactivos unidos de los libres. En los inmunoensayos heterogéneos se requiere la separación de los reactivos no unidos, a menudo utilizando un reactivo de fase sólida unido a una de las biomoléculas (superficie plana o partículas). Estos últimos, a pesar de que son más difíciles de automatizar, son los más utilizados debido a que resultan más específicos y sensibles, presentan simplicidad operativa y pueden ser visualizables por los fenómenos de precipitación, aglutinación y otros mecanismos indirectos (marcaje con fluoresceína, con radioisótopos o con enzimas).

Las etapas necesarias para el desarrollo de inmunoensayos en fase sólida, son el diseño de una superficie que expone el elemento de reconocimiento (Ac o Ag) a través de una interacción fuerte y estable del elemento de reconocimiento con la superficie sin alterar su actividad biológica; el bloqueo de los sitios superficiales libres para evitar la adsorción inespecífica en las etapas posteriores; y el evento de biorreconocimiento (interacción Ag-Ac) empleando alguna técnica adecuada (electroquímica, óptica, térmica, etc.).

Sin embargo, durante los inmunoensayos pueden aparecer interferencias que afectan tanto la sensibilidad como la especificidad. En la mayoría de los casos las interferencias se deben a agentes que interfieren en la unión del Ac con el Ag. Esto se debe a que el acoplamiento estructural Ag-Ac está dado por varias fuerzas débiles que disminuyen con la distancia, como los puentes de hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals, las interacciones electrostáticas y las hidrofóbicas.

Dado que la reacción se debe a fuerzas no covalentes, reversibles, la optimización del tiempo, temperatura, pH, fuerza iónica, concentración de Ag-Ac y calidad de reactivos, son parámetros claves que afectan la respuesta del inmunoensayo. Cada uno de estos parámetros, debe ser examinado y optimizado para la aplicación deseada, ya que determinan el éxito del método de diagnóstico.

1.6.1. Métodos de Inmunodiagnóstico Utilizados de Referencia

Gran parte de los progresos alcanzados por la biología moderna se deben al perfeccionamiento de los métodos analíticos de medida. La introducción de los procedimientos basados en las reacciones inmunológicas ha representado un importante avance en el análisis de sustancias de interés difíciles de medir empleando los métodos bioquímicos habituales.

Los procedimientos inmunológicos, son aquellos que se basan en la especificidad de la unión Ag-Ac. La propiedad que tienen los Ac de unirse a un Ag determinado, la especificidad de esta unión, y el hecho de que pueda ser visualizable por los fenómenos de precipitación, aglutinación y otros mecanismos indirectos (marcaje con fluoresceína, con radioisótopos o con enzimas) hacen que estos métodos se empleen ampliamente.

Existen diversos métodos basados en procedimientos distintos para visualizar la unión Ag-Ac. Así tenemos:

1. Técnicas de aglutinación y precipitación: la reacción Ag-Ac se puede detectar y cuantificar por el aglutinado o precipitado formado. La gran diferencia entre las reacciones de precipitación y las de aglutinación es que en las reacciones de precipitación se emplean Ag solubles mientras que en las reacciones de aglutinación el Ag se encuentra unido o formando parte de células, bacterias o partículas

2. *Técnicas de fluorescencia y citometría de flujo*: para la realización de estas técnicas el anticuerpo se marca con un fluorocromo, detectándose la formación del complejo Ag-Ac por la fluorescencia emitida bajo microscopio de luz ultravioleta. Este procedimiento tiene la limitación del marcaje con un fluorocromo de cada uno de los Ac necesarios para cada una de las sustancias a investigar.

3. *Técnicas de radioinmunoensayo (RIA)*: en estas técnicas al Ac se une un isótopo radiactivo siendo posible la cuantificación del complejo Ag-Ac a través de la radiactividad emitida. Estas técnicas poseen algunos inconvenientes que derivan de la necesidad de utilizar isótopos. Además de su peligrosidad y la obligatoriedad de disponer de instalaciones adecuadas para su utilización, existen isótopos que tienen el inconveniente de su pronta caducidad.

4. *Cromatografía de afinidad*: la especificidad de la unión Ag-Ac puede utilizarse para obtener Ag y Ac puros. Los Ag se unen a la columna, luego se hace pasar la solución que contiene los Ac específicos para el Ag; éstos permanecen unidos a la columna, y aquellos que no se unen son eliminados mediante lavado. En el segundo paso, se eluye la columna, usando un tampón de elución que disocia la unión Ag-Ac para obtener el Ac que se unió. A la inversa, colocando Ac en la columna se tendrá Ag puro.

5. *Inmunoprecipitación e "immunoblotting"*: permite detectar la presencia y cantidad de Ag y Ac específicos. El Ag se extrae de las células mediante lisis. Después, los Ac se añaden al lisado y se forman los inmunocomplejos Ag-Ac que se analizan generalmente por electroforesis en gel.

En el caso particular de la Enfermedad de Chagas, el diagnóstico puede estar basado en la detección de parásitos en sangre por métodos parasitológicos directos o indirectos (fase aguda) o en la detección de anticuerpos IgG anti-T.cruzi por métodos serológicos (fase crónica), cuando la parasitemia en el torrente sanguíneo es baja o nula.

Las técnicas inmunológicas, además de aplicarse en el diagnóstico individual de la enfermedad, son de utilidad en la selección de donantes de sangre, los estudios de prevalencia de Ac específicos en poblaciones para conocer la epidemiología de la enfermedad, y la evaluación del impacto de las medidas de control.

En la actualidad, las reacciones serológicas más utilizadas en la práctica clínica son: HAI, ELISA e IFI.

La técnica HAI, también llamada hemaglutinación reversa pasiva, se basa en la propiedad que tienen los Ac de producir aglutinación específica en presencia de glóbulos rojos sensibilizados con los correspondientes Ag.

El test de ELISA, es una técnica cualitativa para la detección de Ac, donde la identificación de los complejos Ag-Ac, se hace mediante el empleo de enzimas. Aquí, la muestra se diluye en el soporte en el que se encuentran inmovilizados los Ag. Si la muestra contiene los Ac específicos, éstos formarán un complejo con los Ag y permanecerán unidos al soporte. La fracción no unida se elimina por lavado tras lo que se agregan Ac anti-inmunoglobulina humana conjugados con peroxidasa. Si se produjo la reacción en la primera etapa del proceso, se unirá el conjugado. Luego de un nuevo lavado se agrega el sustrato enzimático (peroxidasa, galactosidasa, glucosa oxidasa). En los casos en que se haya unido el conjugado habrá aparición de un producto coloreado soluble cuantificable mediante el lector de ELISA.

La fluorescencia es una propiedad de ciertas moléculas que, al ser irradiadas con energía electromagnética de longitud de onda adecuada, emiten radiación de longitud de onda característica permitiendo su cuantificación. Las moléculas de un colorante fluorescente absorben luz en una longitud de onda y convierten la luz absorbida de alta energía en luz de menor energía. Se aprecia si hubo unión del Ac con el Ag por la fluorescencia emitida, que se observa bajo microscopio de luz ultravioleta. Este

procedimiento (Inmunofluorescencia directa) tiene la limitación del marcaje con un fluorocromo de cada uno de los anticuerpos necesarios para cada una de las sustancias a investigar. Para evitar esto, lo que se hace es tratar el tejido o células con antiseros anti-antígeno y secundariamente anti-inmunoglobulinas marcadas con un fluorocromo (Inmunofluorescencia indirecta).

Las técnicas antedichas presentan alta sensibilidad y especificidad pero tienen ciertas desventajas: a) la realización de los ensayos tarda entre 90 y 100 minutos; b) la IFI requiere de un microscopio especial, consta de varias fases, la interpretación es subjetiva y no se recomienda su utilización para el análisis de un gran número de muestras; y c) la prueba de ELISA consta de varias etapas y requiere kits relativamente caros.

Un método de detección alternativo, es el ensayo de inmunoaglutinación, donde se utilizan partículas de látex como soporte para la fijación de Ag, de manera tal de amplificar la reacción Ag-Ac que se produce en el inmunoensayo. Este método resulta rápido, es de sencilla realización e interpretación, presenta relativamente alta sensibilidad analítica, es especialmente útil en aquellos laboratorios con escaso personal y equipamiento y, en principio, permitiría realizar el diagnóstico al pie del paciente. Las ventajas enumeradas hacen de las reacciones de aglutinación una valiosa herramienta para la búsqueda de anticuerpos específicos contra agentes patógenos y para la detección de Ag en fluidos biológicos, que resulta de particular utilidad en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.

En el caso particular de esta enfermedad, el reactivo de inmunoaglutinación está compuesto por Ag del parásito soportados sobre la superficie de partículas de látex. Si estos complejos látex-proteína se mezclan en proporciones adecuadas con los Ac específicos presentes en el suero de un paciente infectado, este se unirá específicamente al Ag unido a las partículas, produciendo la aglutinación de las mismas.

En la reacción Ag-Ac, existe un rango de concentración apropiada en el cual los complejos inmunes (CI) se hacen visibles. Así, cuando se agregan concentraciones crecientes de Ag a una cantidad fija de suero conteniendo Ac específicos, la cantidad de complejos Ag-Ac aumenta hasta alcanzar un máximo, luego del cual declina (Fig. 1.19). En un extremo de la curva, debido a que hay pequeñas cantidades de Ag presentes, los complejos inmunes (CI) no se hacen visibles debido a un exceso de Ac. (zona de exceso de Ac). En el otro extremo, al estar presente grandes cantidades de Ag, los CI no se forman, o si lo hacen, son pequeños y probablemente constituidos por una molécula de Ac y dos de Ag (zona de exceso de Ag). Entre estas dos situaciones extremas se encuentra la zona de equivalencia, en donde la interacción Ag-Ac permite la formación de grandes redes de CI que llevará a la aparición de un aglutinado que se visualiza como grumos.

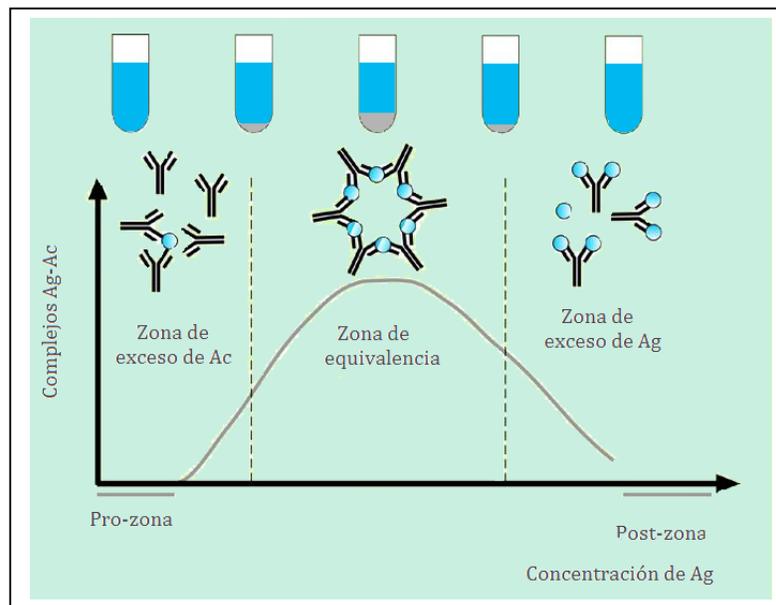


Figura 1.19. Curva de aglutinación cuantitativa durante la interacción Ag-Ac.

Si bien se puede emplear el método visual para la detección y seguimiento de la reacción de aglutinación (Quast *et al.*, 1978; Kitano *et al.*, 1987; Okubo *et al.*, 1987; Basinska y Slomkowski, 1993; Peula *et al.*, 1994), los métodos basados en técnicas instrumentales como: turbidimetría (Litchfield *et al.*, 1984; Peula *et al.*, 1995;

Ortega-Vinuesa *et al.*, 1996), nefelometría (Kapmeyer *et al.*, 1988; Montagne *et al.*, 1992; Sarobe *et al.*, 1996) y DLS (Cohen y Benedek, 1975), permiten una mayor objetividad, sensibilidad y exactitud, aunque estas varían en función del método utilizado para detectar la aglutinación.

En el presente trabajo de Tesis se desea estandarizar y evaluar la validez de la técnica de aglutinación de partículas de látex, mediante el desarrollo de un reactivo de inmunoaglutinación basado en proteínas recombinantes del *T. cruzi*, a fin de aumentar la especificidad del ensayo y disminuir las reacciones cruzadas.

1.6.2. Evaluación de la Sensibilidad y Especificidad de un Inmunoensayo

La medicina es una ciencia de probabilidades y un arte de manejar la incertidumbre. Dicha incertidumbre se extiende no sólo a las actividades preventivas y terapéuticas sino también a las diagnósticas.

Con mucha frecuencia los resultados de las pruebas diagnósticas están distribuidos en una escala continua, por lo que es necesario seleccionar un punto de corte o valor límite adecuado que permita resumir estos resultados en dos categorías: positivo y negativo.

La evaluación de las pruebas diagnósticas se ha tratado, en general, sin un criterio universalmente aceptado. En diferentes estudios aparecen términos como sensibilidad (S), especificidad (E), eficiencia, exactitud, utilidad, valor, eficacia y efectividad, pero a menudo el significado de los mismos es ambiguo.

La ausencia de acuerdo, tanto en el concepto, como en la medida de la calidad de una prueba diagnóstica, crea una situación de confusión a la hora de resolver cuestiones concretas.

La calidad de una prueba diagnóstica no se juzga sólo por sus características analíticas sino, fundamentalmente, por su capacidad para distinguir entre estados alternativos de salud.

Las condiciones que deben ser exigidas a un test de diagnóstico son exactitud y reproducibilidad. A su vez, es conveniente que el test sea sencillo de aplicar, que tenga los mínimos efectos adversos y que económicamente sea soportable.

Clásicamente, la exactitud de una prueba diagnóstica se evalúa a partir de los conceptos de sensibilidad (S) y especificidad (E). La sensibilidad, hace referencia a la probabilidad de obtener un resultado positivo cuando el individuo tiene la enfermedad; es decir, mide la capacidad del ensayo de detectar la enfermedad cuando está presente. Por otro lado, la especificidad, refleja la probabilidad de obtener un resultado negativo cuando el individuo no tiene la enfermedad; mide su capacidad para descartar la enfermedad cuando no está presente.

En aquellas pruebas que ofrecen resultados en un rango continuo es necesario establecer un punto de corte que divida los resultados en positivos y negativos para poder calcular su sensibilidad y su especificidad frente a un método de referencia, ya que éstas varían en función del criterio elegido como punto de corte.

La forma más global de conocer la exactitud de una prueba diagnóstica en el espectro completo de puntos de corte es mediante el uso de curvas ROC (receiver operating characteristics). Las curvas ROC tuvieron sus primeras aplicaciones en medicina en el campo del radiodiagnóstico (Metz, 1986). Robertson y Zweig. (1981) y Van Steirteghem *et al.* (1982) las utilizaron por primera vez en la evaluación de pruebas de laboratorio. Sucesivamente, diversos autores publicaron curvas ROC como resultados de sus estudios (Kadar *et al.*, 1982; Ryan *et al.*, 1983; Marchand *et al.*, 1983; Leroux *et al.*, 1984; Kim *et al.*, 1984; Carson *et al.*, 1985; Hermann *et al.*, 1986; Leung *et al.*, 1989;

Kazmierczack *et al.*, 1991; Dupont *et al.*, 1991; De Wit *et al.*, 1991; Ricker *et al.*, 1991; Amico *et al.*, 1991; Lott *et al.*, 1991; Guyatt *et al.*, 1992; Flack *et al.*, 1992; Zweig *et al.*, 1992; Kazmierczack *et al.*, 1993)

La curva ROC indica la exactitud diagnóstica y proporciona un criterio unificador en el proceso de evaluación de una prueba y uso de las pruebas diagnósticas (Zweig, 1992); y es una generalización de los conceptos clásicos de sensibilidad y especificidad. Además, el análisis estadístico de las curvas ROC proporciona resultados cuantitativos muy útiles en la evaluación y comparación de pruebas diagnósticas.

La curva ROC es, simplemente, un gráfico en el que se observan todos los pares sensibilidad/especificidad resultantes de la variación continua de los puntos de corte en todo el rango de resultados observados. Cada punto de la curva representa un par S/1-E correspondiente a un nivel de decisión determinado. Una prueba con discriminación perfecta, tiene una curva ROC que pasa por la esquina superior izquierda (sensibilidad = especificidad = 1). Una prueba sin discriminación, da lugar a una línea diagonal de 45°, desde la esquina inferior izquierda hasta la superior derecha. La prueba diagnóstica ideal debería tener una sensibilidad y una especificidad tan próximas al 100 % como fuera posible (Fig. 1.20).

De acuerdo con Zweig y Campbell (1993.), el uso de las curvas ROC en la evaluación de pruebas diagnósticas presenta las siguientes ventajas:

1. Son una representación fácilmente comprensible de la discriminación de la prueba en todo el rango de puntos de corte.
2. Son simples, gráficas y fáciles de interpretar visualmente.
3. No requieren un nivel de decisión particular porque está incluido todo el espectro de puntos de corte.

4. Son independientes de la prevalencia. Por tanto, no es necesario tener cuidado para obtener muestras con prevalencia representativa de la población.
5. Proporcionan una comparación visual directa entre pruebas en una escala común.
6. La especificidad y la sensibilidad se pueden obtener directamente del gráfico.

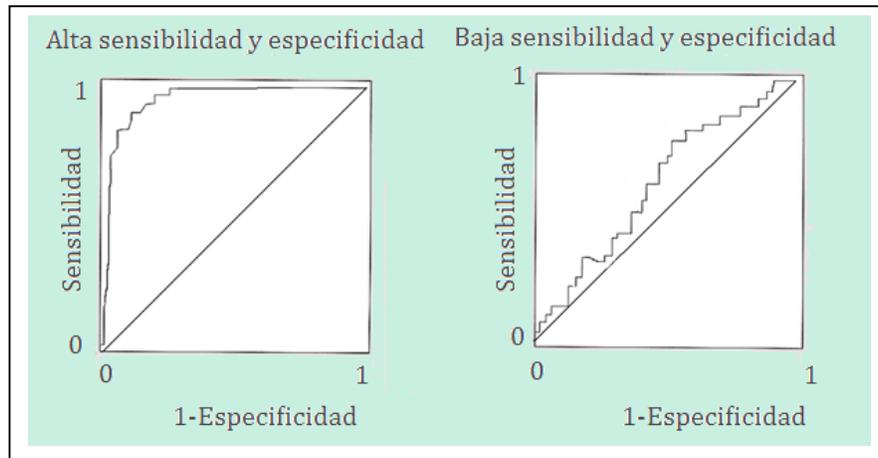


Figura 1.20. Representación esquemática de la curva ROC en dos situaciones extremas.

CAPITULO 2: SINTESIS CONTROLADA, LIMPIEZA Y CARACTERIZACION DE LATEX FUNCIONALIZADOS

2.1. INTRODUCCION

Existe un gran interés en el desarrollo de coloides poliméricos funcionalizados para uso biomédico (Pichot *et al.*, 1997), siendo una de sus aplicaciones la producción de reactivos de aglutinación para el diagnóstico de enfermedades o estados patológicos (Cohen y Benedek, 1975; Quast *et al.*, 1978; Litchfield *et al.*, 1984; Kapmeyer *et al.*, 1988; Kapmeyer, 1991; Montagne *et al.*, 1992; Basinska y Slomkowski, 1993; Peula *et al.*, 1995; Santos y Forcada, 1996; Quesada *et al.*, 1996; Sarobe *et al.*, 1996; Ortega-Vinuesa *et al.*, 1996a; Miraballes-Martínez *et al.*, 1997; Molina-Bolivar y Ortega-Vinuesa, 1999; Peula-García *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2003; Okumura *et al.*, 2004; Lucas *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Dey *et al.*, 2007; Magalhães Andrade *et al.*, 2007; Polpanich *et al.*, 2007; Okumura *et al.*, 2008).

En la actualidad, la mayoría de las investigaciones dedicadas al inmunodiagnóstico mediante ensayos de aglutinación se centran en la obtención de complejos látex-proteína mediante unión covalente. Para realizar este tipo de unión, es necesario sintetizar partículas de látex con una funcionalidad superficial tal que pueda reaccionar eficazmente con las proteínas.

Los procesos de polimerización en emulsión son de gran importancia industrial, ya que a través de un control adecuado de las condiciones experimentales se pueden obtener sistemas coloidales con diferentes tamaños de partícula, grados de monodispersidad y características superficiales, capaces de cumplir los requisitos necesarios para su utilización en inmunoensayos. Las alternativas para su síntesis son operaciones “batch” o “semibatch” no sembradas; o presembradas. En este último caso, se polimeriza un monómero o una mezcla de monómeros en presencia de un látex de siembra (habitualmente PS), para obtener partículas con morfologías de tipo núcleo-coraza o “core-shell”. De este modo resulta más simple el control simultáneo del tamaño, la morfología y la densidad de carga superficial de las partículas de polímero.

Durante la polimerización en emulsión, para obtener látex uniformes en tamaño y forma, con distribuciones de tamaño de partículas (DTPs) muy angostas, se deben tener los siguientes cuidados: a) la etapa de nucleación debe ser lo más corta posible; b) se debe evitar la nucleación múltiple, los procesos de coagulación al azar, y la presencia de impurezas o inhibidores (Sáenz y Asua, 1995); c) las condiciones de reacción (temperatura y velocidad de agitación) se deben controlar adecuadamente; y d) el crecimiento de las partículas debe ser aproximadamente constante (Sugimoto, 2001).

En una polimerización en emulsión libre de emulsificante, es posible que la DTP del látex resultante contenga una población principal “cuasi-monodispersa” contaminada con una pequeña fracción de partículas de mayor tamaño. En presencia de emulsificante en cambio, esta situación es menos frecuente.

Los látex utilizados en inmunodiagnóstico deben ser monodispersos para: a) aumentar la estabilidad coloidal; b) asegurar un reparto homogéneo de las proteínas sobre la superficie de las partículas (Tsaour y Fitch, 1987); y c) lograr una mejor

visualización de la reacción de aglutinación que se produce en el inmunoensayo.

Para la caracterización morfológica y de tamaño de partícula de los sistemas coloidales se pueden utilizar técnicas de: i) observación directa; ii) dispersión de luz; y iii) fraccionamiento (Gugliotta *et al.*, 2010). Entre las primeras se encuentran la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), que permiten visualizar las partículas para determinar su forma y tamaño. Estas técnicas presentan la desventaja que sólo permiten observar una pequeña fracción de partículas, que no siempre es representativa de la población total y por lo tanto podrían presentar inconvenientes para cuantificar pequeñas fracciones de partículas contaminantes y DTP anchas. Si bien la TEM y la SEM constituyen las principales técnicas de referencia para observar y caracterizar partículas de látex, las mediciones son costosas y requieren de tiempo; la preparación de la muestra es compleja y la evaluación adecuada de la DTP puede involucrar el recuento de miles de partículas (Kourti, 1989; Lloset *et al.*, 1996).

Las técnicas de dispersión de luz dinámica a simple ángulo (DLS) y de turbidimetría (T), producen estimaciones rápidas y confiables de los diámetros de partícula promedio. Sin embargo, pueden dar lugar a estimaciones bastante inexactas de la DTP (Kourti, 1989; Lloset *et al.*, 1996; Gugliotta *et al.*, 2000; Gonzalez *et al.*, 2005; Gugliotta *et al.*, 2010). Cuando dichas mediciones se realizan a múltiples ángulos y/o a múltiples longitudes de onda, mejora la estimación de la DTP. Así por ejemplo, la técnica de DLS a múltiples ángulos (MDLS) muestra alta sensibilidad para determinar contaminaciones con partículas grandes de látex “cuasi-monodispersos” (Gonzalez, 2004; Gonzalez *et al.*, 2005).

Además de la caracterización morfológica y de tamaño de partícula, es importante la caracterización superficial de las partículas coloidales, debido a que muchas de sus propiedades están determinadas por la presencia de grupos químicos cargados

sobre su superficie. Estos grupos funcionales superficiales se originan por adsorción de ciertos iones o por disociación de grupos superficiales ionizables del polímero, provenientes de restos del iniciador o debidos a la presencia de monómeros funcionales.

La densidad de carga superficial generalmente se determina mediante valoración conductimétrica (Hen, 1974; Sakota y Okaya, 1976; Labib y Robertson, 1980; Shirahawa y Suzawa, 1985; Zwetsloot y Leyte, 1996; Gonzalez, 2004; Gonzalez *et al.*, 2008). Consiste en estudiar la evolución de la conductividad de la muestra, determinada por la suma de los productos de las concentraciones de todos los iones presentes por sus conductividades equivalentes, frente al agregado de una disolución valorante (Labib y Robertson, 1980).

La estabilidad coloidal mide la capacidad de las partículas de permanecer como entidades aisladas en el medio que las rodea durante largos períodos de tiempo. Si esto ocurre, entonces el sistema es estable. Si por el contrario, las partículas coagulan, entonces el sistema es inestable. La estabilidad de un látex se puede expresar mediante la concentración crítica de coagulación (*c.c.c.*), que se define como la mínima concentración de un electrolito a la que coagulan rápidamente las partículas (Molina-Bolívar, 1999). La forma más sencilla para determinar la *c.c.c.* es mediante la observación visual. Sin embargo, para conseguir una mayor objetividad y aumentar la sensibilidad de la medición, son recomendables los métodos instrumentales como la DLS, la T, la nefelometría y la anisotropía angular (Ortega-Vinuesa *et al.*, 1997).

La primera parte de este capítulo estará dedicada a la síntesis de partículas de látex con morfología núcleo-coraza (o “core-shell”), con grupos funcionales superficiales carboxilo o acetal, que son necesarios para el acoplamiento covalente de las proteínas. Las partículas carboxiladas se sintetizarán mediante copolimerización en emulsión “semibatch” de estireno (St) y ácido metacrílico (AMA), mientras que para la síntesis de

partículas con funcionalidad acetal, se realizará una copolimerización “batch” en emulsión de St y acroleína dietil acetal (ADEA). En ambos casos, las polimerizaciones se realizarán sobre siembras monodispersas de PS y en ausencia de emulsificante.

Posteriormente se procederá a la limpieza de los látex, a fin de eliminar restos de monómero, de iniciador y de otros electrolitos que pueden estar presentes en el medio e interferir negativamente tanto en la etapa de sensibilización de las partículas con proteínas, como durante la realización del inmunoensayo. Finalmente, se realizará la caracterización superficial y morfológica de los látex producidos.

2.2. TRABAJO EXPERIMENTAL

2.2.1. Reacciones de Polimerización

2.2.1.1. Materiales y Métodos

Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en un reactor de vidrio encamisado de 1 litro de capacidad, con un baño termostático para regular la temperatura de reacción, un agitador de paletas de acero inoxidable, y entradas para el burbujeo continuo de nitrógeno, toma de muestras, y alimentación o carga. La Fig. 2.1 muestra un esquema y una foto del sistema utilizado para efectuar las reacciones de polimerización.

El monómero St empleado corresponde a un grado técnico, y fue provisto por Petrobras Energía S.A.. El mismo fue destilado a presión reducida para su purificación y eliminación de los inhibidores de la polimerización. El AMA (Merk) y el ADEA (Fluka) se utilizaron como fueron suministrados. El iniciador empleado fue persulfato de potasio, $K_2S_2O_8$ (Mallinckrodt). Se usó además agua ultrapura destilada y deionizada (DDI).

Se extrajeron muestras a lo largo de las reacciones para seguir la evolución de la conversión (x) y de los tamaños medios de partícula (D_{DLS}) por DLS. Estos últimos, se

midieron a 30°C y a un ángulo de detección de 90°, en un fotómetro de dispersión de luz marca Brookhaven con un láser de He-Ne (632.8 nm) polarizado verticalmente, y un correlador digital (Modelo BI-2000 AT). Para evitar la dispersión múltiple, la concentración de las partículas se ajustó hasta obtener alrededor de 2×10^5 cuentas/s. Además, se utilizaron tiempos de medición variables entre 100 y 200 segundos (Vega *et al.*, 2003b).

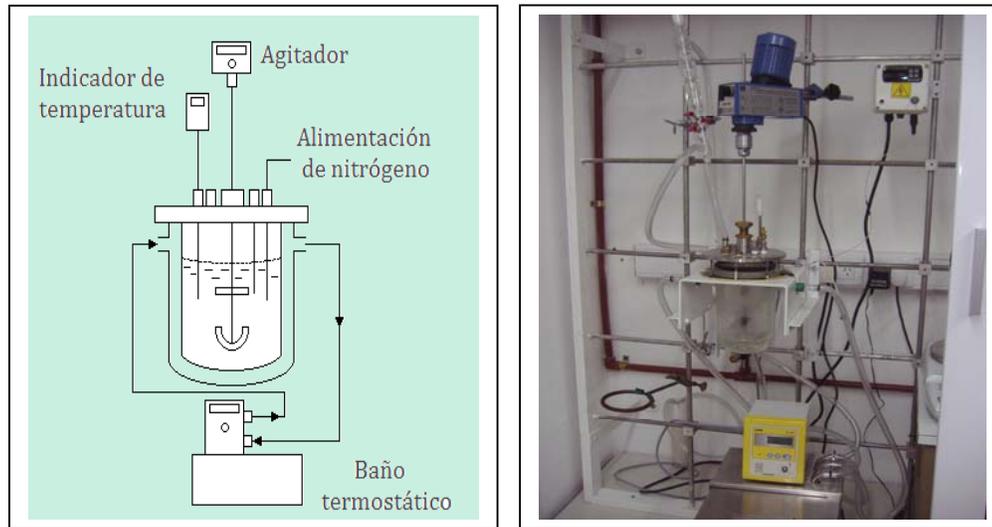


Figura 2.1. Esquema y foto del equipo experimental utilizado para las polimerizaciones.

La conversión global de monómeros se determinó por gravimetría. Para ello, las muestras de látex del reactor se pesaron y secaron en estufa a 35 °C hasta pesada constante. En cada muestra (de aproximadamente 2 gr.), se detuvo la reacción por agregado de una gota de solución de hidroquinona al 1%. El peso de la muestra seca consiste no sólo de la masa de polímero formado durante la reacción sino también del conjunto de sólidos no poliméricos (como las sales provenientes del iniciador) y la siembra (en el caso de la polimerización sembrada). Tanto para los látex siembra, como para los látex funcionalizados, la conversión global se calculó mediante la siguiente expresión:

$$x = \frac{\frac{\text{peso de la muestra seca}}{\text{peso del látex}} - \frac{\text{peso de sólidos no poliméricos}}{\text{peso total}} - \frac{\text{peso de la siembra}}{\text{peso total}}}{\frac{\text{monómero total}}{\text{peso total}}} \quad (2.1)$$

donde, el peso del látex hace referencia al peso de la muestra extraída del reactor durante el proceso de polimerización, y el peso de la muestra seca correspondiente a la misma llevada a sequedad hasta pesada constante. El término monómero total hace referencia a la suma de las concentraciones de los distintos monómeros adicionados durante la reacción, mientras que el peso total es la sumatoria de las concentraciones de todos los ingredientes de la receta.

2.2.1.2. Látex de Poliestireno

El látex de PS fue sintetizado en base a la receta utilizada por Gonzalez (2004). Se utilizó el siguiente procedimiento: se agregó el agua al reactor y se agitó bajo corriente de N₂ hasta alcanzar la temperatura de reacción. Luego, se adicionó el monómero, se mantuvo el sistema bajo agitación a 250 rpm durante 1 hora, y bajo corriente de N₂, (a un caudal de 50 cm³/min). Finalmente, se adicionó el iniciador disuelto en agua para dar comienzo a la polimerización.

El látex S4 se sintetizó en ausencia de emulsificante. En la Tabla 2.1, se muestra la receta, las condiciones de síntesis y los resultados finales de conversión y diámetro de partícula. En la Fig. 2.2 se muestra la evolución de x y D_{DLS} a lo largo de la reacción. Nótese que: i) la x se mantuvo prácticamente constante después de 4 h de reacción, con un valor final de 71%; ii) el D_{DLS} también crece en ese período y alcanza un valor final de 300 nm.

Aún cuando no se muestran resultados en esta Tesis, se sabe que en presencia de emulsificante se acelera la velocidad de nucleación, y es posible obtener partículas de

menor tamaño a mayores velocidades de reacción.

Tabla 2.1. Recetas, condiciones de reacción y características del látex de PS.

Reacción ^(a)	S4
St (g)	50
K ₂ S ₂ O ₈ (g)	0,6
H ₂ O DDI (g)	750
Conversión (x, %)	71
Diámetro (D_{DLS} , nm)	300

^(a) temperatura: 80 °C; tiempo: 10 h

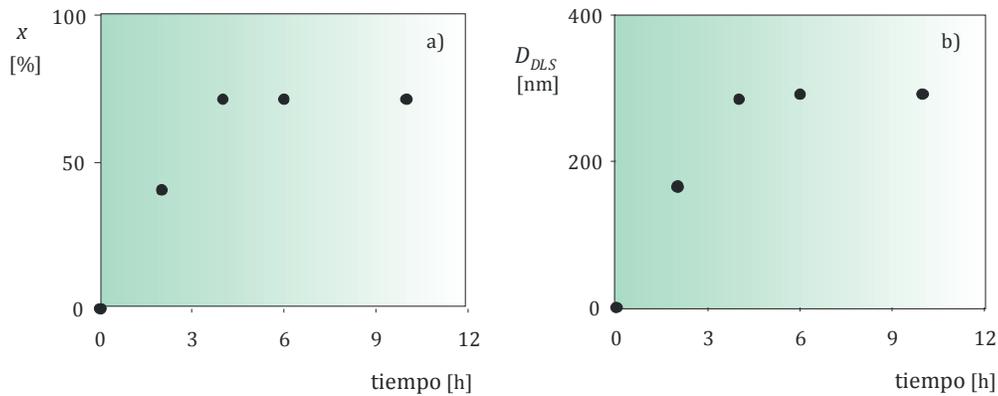


Figura 2.2. Evolución de la conversión (a) y del diámetro medio de partícula medido por DLS a 90° (b) del látex de PS S4 sintetizado mediante polimerización en emulsión.

2.2.1.3. Látex con Funcionalidad Carboxilo

La síntesis del látex con funcionalidad carboxilo, se realizó en base a la receta propuesta en Gonzalez *et al.* (2008), mediante copolimerización en emulsión “semibatch” de St y AMA sobre el látex S4 de PS, que se usó como siembra, en ausencia de emulsificante. La receta y las condiciones de síntesis se presentan en la Tabla 2.2. El proceso “semibatch” resultó ser más eficiente que la operación “batch” convencional para aumentar la densidad de carga de las partículas. Se cargó inicialmente en el reactor la siembra de PS, la mayor parte del St y el agua DDI, y se mantuvo el sistema bajo agitación a temperatura ambiente y bajo corriente de N₂ durante 2 horas, para producir el hinchamiento de las partículas. Se elevó luego la temperatura a 70 °C y se adicionó la

mitad del iniciador. Transcurridas 4 horas de reacción, se agregó el iniciador restante, y una mezcla de St y AMA, de aproximadamente 0,36 gr.

Tabla 2.2. Receta, condiciones y características del látex obtenido en la copolimerización “semibatch” de estireno y ácido metacrílico.

	Reacción R2 ^(a)	
	t = 0 h	t = 4 h
Siembra S4 (g) ^(b)	75	
St (g)	10,703	0,1528
AMA (g)	-	0,2066
H ₂ O DDI (g)	750	-
K ₂ S ₂ O ₈ (g)	0,7850	0,7850
Conversión (x, %)		88
Diámetro (D_{DLS} , nm)		373
Espesor de la corteza (nm)		36,5

^(a) temperatura 70°C; tiempo de reacción 10 h.

^(b) % sólidos = 2,2.

Las evoluciones experimentales de x y D_{DLS} se muestran en la Fig. 2.3, y los valores finales en la Tabla 2.2. Después de las 4 hs de reacción se observa un salto importante en la x (calculada sobre la base del monómero total adicionado al final de la reacción), como consecuencia del agregado impulsional del iniciador y de los monómeros, alcanzando un valor final de 88%. El agregado impulsional del AMA, se realizó con la finalidad de obtener una densidad superficial de grupos carboxilo elevada, mientras que el agregado intermedio del iniciador se realizó con el objeto de alcanzar una elevada x , y para conseguir un mayor crecimiento de las partículas.

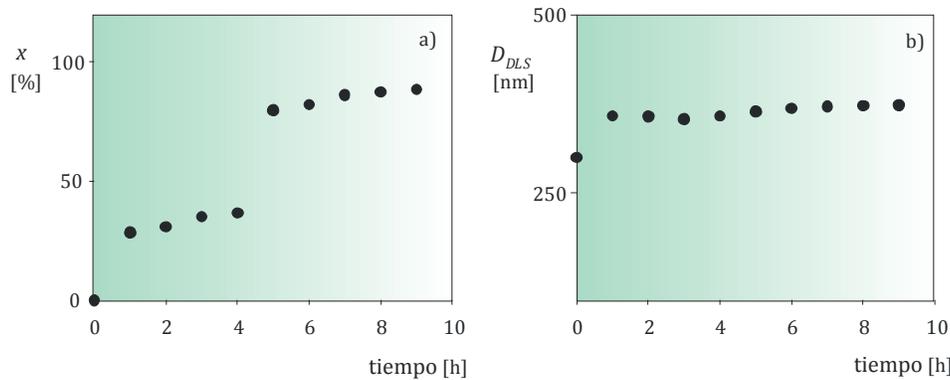


Figura 2.3. Evolución de la conversión (a) y de los tamaños medios de partícula medidos por DLS a 90° (b) del látex R2.

2.2.1.4. Látex con Funcionalidad Acetal

Se realizaron copolimerizaciones en emulsión “batch” de St y ADEA sobre el látex de siembra S4 de PS, en ausencia de emulsificante. Se sintetizaron dos látex denominados A1 y A2, cuya síntesis difiere básicamente en el sistema iniciador utilizado. En la Tabla 2.3 se presentan las recetas y condiciones de reacción empleadas, que están basadas en las propuestas por Santos Pérez (1997), pero son de un menor contenido de sólidos. Mientras que en A1 se utilizó un iniciador disociativo ($K_2S_2O_8$) y la polimerización se efectuó a 70°C, en A2 se empleó un sistema iniciador redox ($K_2S_2O_8$ / $Na_2S_2O_5$) y la reacción se llevó a cabo a 60°C. El procedimiento de reacción fue el siguiente: se cargó en el reactor la siembra de PS, el $NaHCO_3$, el agua, y los comonómeros St y ADEA, y se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente bajo corriente de N_2 durante 2 horas para producir el hinchamiento de las partículas. Posteriormente se elevó la temperatura y se agregó iniciador para dar comienzo a la reacción.

Tabla 2.3. Recetas, condiciones y características del látex obtenido en la copolimerización “batch” de estireno y acroleína dietil acetal.

Reacción	A1 ^(a)	A2 ^(b)
Siembra S4 (g) ^(c)	75	100
St (g)	1,24	1,86
ADEA (g)	0,62	2,32
$NaHCO_3$ (g)	0,39	1,58
H_2O DDI (g)	750	700
$K_2S_2O_8$ (g)	0,39	1,58
$Na_2S_2O_5$ (g)	-	0,557
Conversión (x, %)	29	28
Diámetro (D_{DLS} , nm)	330	336
Espesor de la corteza (nm)	15	18

^(a) temperatura 70°C, tiempo 10 h.

^(b) temperatura 60°C, tiempo 6 h.

^(c) % sólidos = 2,2.

En la Fig. 2.4 se muestran las evoluciones de x y D_{DLS} obtenidas. Las bajas conversiones finales (29% para A1 y 28% para A2), inferiores a las reportadas en la

literatura (65%, Sanz-Izquierdo et al., 2004), son esperadas para recetas de bajas concentraciones de partículas, y de bajas concentraciones de monómeros, que involucran a un monómero poco reactivo (ADEA), pero podrían resultar también de un hinchamiento insuficiente de las partículas de siembra con la mezcla de monómeros. Como resultado de las bajas x obtenidas, se observó un leve aumento en el D_{DLS} respecto a la siembra S4 (300 nm), y los espesores de las cortezas resultaron de 15 nm para A1 y 18 nm para A2.

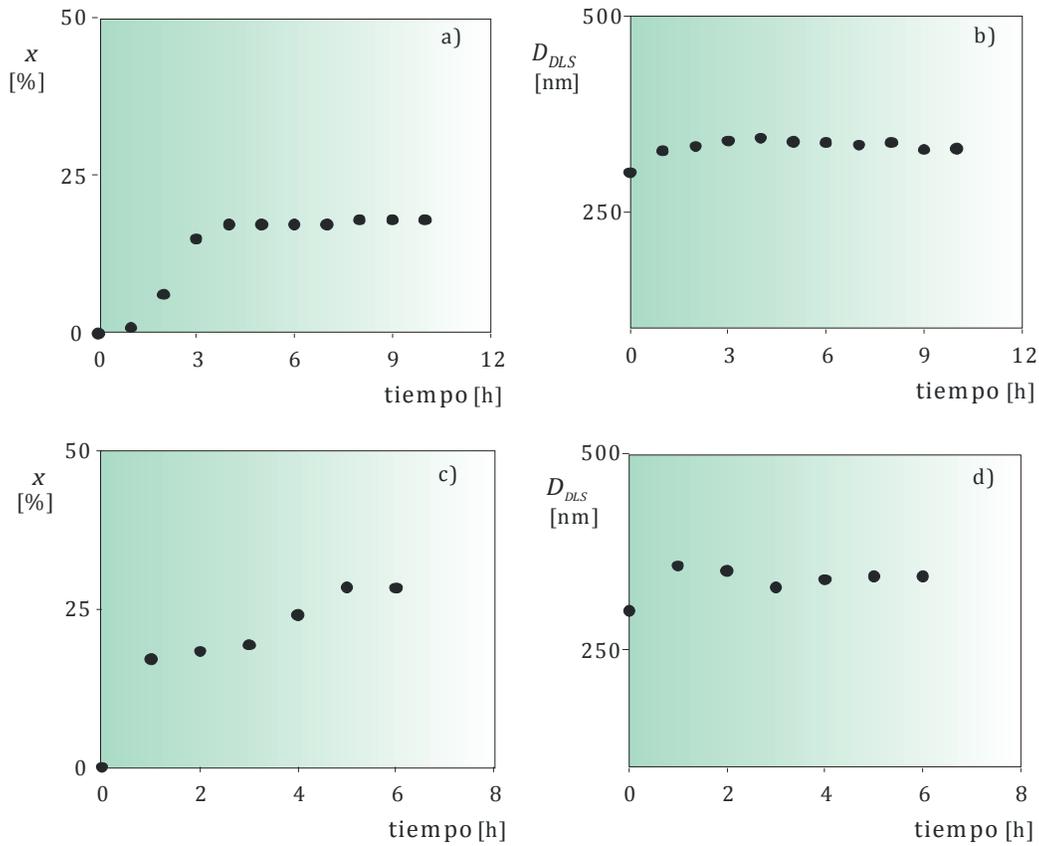


Figura 2.4. Evolución de la conversión y de los tamaños medios de partícula medidos por DLS a 90° de los látex con funcionalidad acetal A1 (a; b) y A2 (c; d).

2.2.2. Limpieza de los Látex

Antes de la caracterización de las partículas de látex, se procedió a su limpieza para retirar los restos no reaccionados de monómero e iniciador como así también los

oligómeros y polielectrolitos solubles en fase acuosa o adsorbidos sobre la superficie de las partículas.

La purificación de los látex se realizó mediante las técnicas de desplazamiento de suero (S4 y R2) y centrifugación-resuspensión (A1 y A2). En el método de desplazamiento de suero, el látex se introdujo en una celda de 70 mL de capacidad que en su base posee un filtro microporoso (Nucleopore) soportado sobre un disco perforado de polietileno. Por la parte superior de la celda se hizo pasar un flujo continuo de agua DDI para arrastrar los componentes que se quieren eliminar hacia la base del recipiente donde se recogió el medio de dispersión o suero. El proceso de limpieza se monitoreó midiendo la conductividad del efluente de salida. Cuando ésta resultó cercana a la del agua DDI con la que se lavó (menor de $2 \mu\text{S}/\text{cm}$), entonces se consideró que el látex estaba limpio.

En el proceso de lavado mediante centrifugación-resuspensión, los látex se colocaron en tubos eppendorf y fueron centrifugados a una velocidad capaz de sedimentar las partículas (10000 rpm) durante 10 minutos. Luego se separó la fase acuosa, donde se encuentran todas las especies que se quieren eliminar, de las partículas de látex sedimentadas en el fondo del tubo de centrifugación. Las partículas sedimentadas se sonicaron y resuspendieron en agua DDI. Este ciclo se repitió hasta que la fase acuosa alcanzó la conductividad del agua ultrapura ($2 \mu\text{S}/\text{cm}$).

2.2.3. Caracterización de Tamaños de Partículas

2.2.3.1. Determinación de los Diámetros Medios

Para determinar el tamaño medio de las partículas de los látex sintetizados, se emplearon las técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Dispersión de Luz Dinámica a 90° (DLS), y Turbidimetría (T).

El equipo de SEM fue un JEOL-JSM 35C. Para la preparación de las muestras, una gota de látex diluido se secó sobre un portamuestras de vidrio, y se usó un evaporador Veeco para cubrir a las partículas con un film delgado de oro.

En la Fig. 2.5 se muestran micrográficas de los látex sintetizados. La mayor parte de las mismas, muestran solamente a la población principal de partículas, aunque unas pocas micrográficas exhibieron partículas de tamaño distinto al del diámetro promedio.

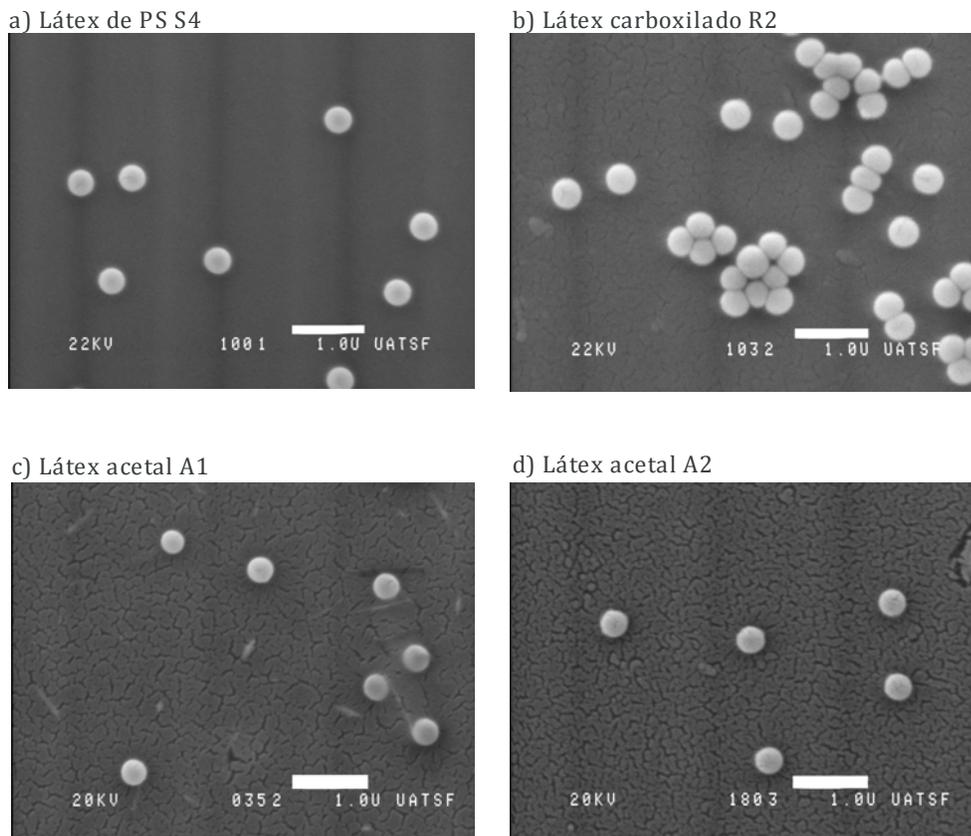


Figura 2.5. Micrográficas SEM de los látex sintetizados: a) látex de PS S4 con morfología homogénea; b) látex con funcionalidad carboxilo, R2, con morfología “core-shell”; c y d) látex con funcionalidad acetal, A1 y A2, con morfología “core-shell”.

El microscopio se calibró con un látex estándar de PS de 348 nm, y después de contar alrededor de 500 partículas de la población principal, se determinó su diámetro

promedio (D_{SEM}). Los diámetros medios obtenidos se muestran en la tercera columna de la Tabla 2.4.

El D_{DLS} , se calculó a través del método de los cumulantes cuadrático (Koppel, 1972), utilizando la Ec. (1.5), a partir de las funciones de autocorrelación medidas y los siguientes datos de parámetros y condiciones de reacción: $k_B = 0,0138 \text{ g nm}^2/\text{s}^2 \text{ K}$, $\lambda_{DLS} = 632,8 \text{ nm}$, $n_m(\lambda_{DLS}) = 1,3316$, $T_0 = 298,15 \text{ K}$, y $\eta = 0,89 \times 10^{-9} \text{ g/nm s}$. Los diámetros medios obtenidos se muestran en la cuarta columna de la Tabla 2.4.

Las mediciones de T se efectuaron a $\lambda = 300 \text{ nm}$ en un espectrofotómetro UV-vis Perkin Elmer Lambda 25 a temperatura ambiente. Para evitar la dispersión múltiple, el látex se diluyó a una concentración final de $3 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$. Los diámetros promedio, se calcularon a partir de la Ec. (1.13), a partir de los espectros de turbidez medidos y utilizando los siguientes datos: $c = 3 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^3$; $\rho = 1,04 \text{ g/cm}^3$; $n_m(\lambda_j)$ para el agua pura (Kerker, 1969); y $n_p(\lambda_j)$ para el PS (Inagaki *et al.*, 1977). Los diámetros medios resultantes se muestran en la quinta columna de la Tabla 2.4. En el caso del A1 no se obtuvo una buena estimación por este método.

Tabla 2.4. Diámetro medio de partículas obtenidos por SEM, DLS y T.

Látex	Morfología	D_{SEM} (nm)	$D_{DLS} 90^\circ$ (nm)	D_T (nm)
S4	homogénea - PS	285	300	303
R2	“core-shell” - carboxilado	365	373	364
A1	“core-shell” - acetal	320	330	-
A2	“core-shell” - acetal	330	336	338

Los diámetros medios estimados a partir de las mediciones de DLS son mayores a los obtenidos por SEM debido a que en microscopía se mide el diámetro de las partículas secas, mientras que en DLS y T se determina el diámetro hidrodinámico de las mismas.

Los diámetros promedio D_{DLS} y D_T se pueden estimar en forma rápida y exacta. Sin embargo, ambos promedios dependen de las condiciones de medición. Mientras D_{DLS} depende del ángulo de detección, θ , D_T depende de la longitud de onda de la luz λ . Además ninguno de los promedios (D_{DLS} o D_T) se pueden asociar a algún promedio absoluto (Gugliotta *et al.*, 2010).

En general, la DLS es preferible a la T debido a que la primera técnica requiere de menor información a priori para su tratamiento de datos. Ésta puede ser una limitación importante para la T cuando la naturaleza de las partículas y es desconocida, y por lo tanto no se puedan obtener sus parámetros ópticos directamente de la literatura.

Finalmente, se analizó el grado de monodispersidad de los látex. Para ello se realizaron mediciones de MDLS a 30°C, y a los siguientes ángulos de detección: 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 100°, 110°, 120°, 130°, y 140°. La concentración de las partículas se ajustó a cada ángulo de medición hasta obtener alrededor de 2×10^5 cuentas/s; y los tiempos de medición variaron entre 100 y 200 segundos (Vega *et al.*, 2003b).

En la Fig. 2.6 se representan los diámetros promedio obtenidos a cada ángulo de detección para los látex S4 y R2. Si el látex es monodisperso, el D_{DLS} es siempre el mismo, independientemente del ángulo de medición.

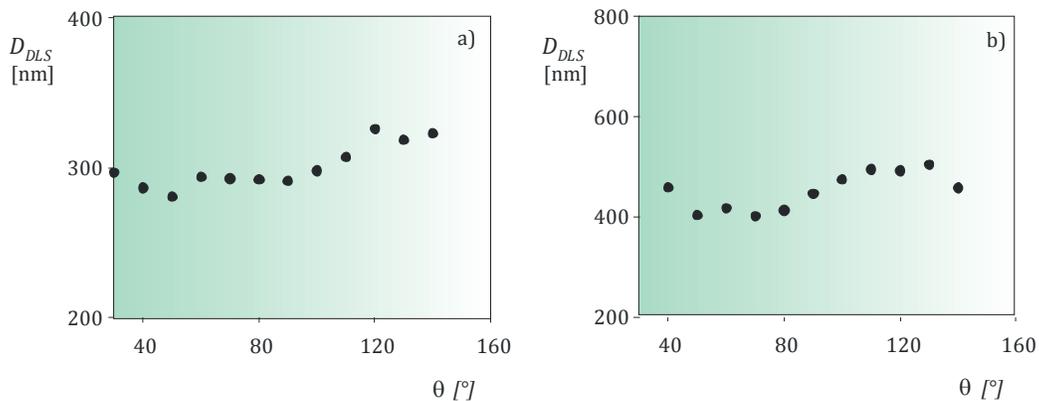


Figura 2.6. Diámetros promedio de DLS en función del ángulo de detección. a) látex de PS S4; b) látex carboxilado R2.

En los casos analizados, las oscilaciones en el D_{DLS} observadas estarían indicando que los látex no son estrictamente monodispersos. Sin embargo, un comportamiento similar se observó cuando se analizó un estándar de PS.

2.2.4. Caracterización Superficial

Se determinó la densidad de carga superficial y la densidad de grupos funcionales superficiales mediante titulación conductimétrica. Las valoraciones se efectuaron con una solución acuosa de NaOH (Cicarelli) de concentración 0.036 M, previamente valorada con biftalato de potasio (sustancia patrón) (Cicarelli). Se empleó un conductímetro automático marca KEM, modelo At-510 y el agente valorante se dosificó automáticamente con intervalos de espera de 10 segundos para dar tiempo a una correcta homogenización de la mezcla valorada y tomar la medida de conductividad. Las valoraciones se realizaron a temperatura ambiente y hasta asegurar un exceso de NaOH.

La Fig. 2.7 muestra la valoración conductimétrica de una solución de Biftalato de Potasio con la solución valorante de NaOH.

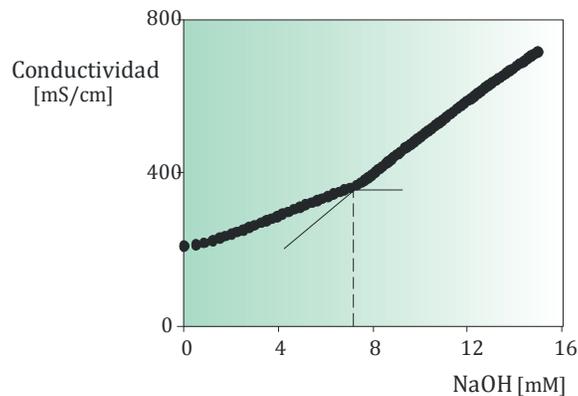


Figura 2.7. Valoración conductimétrica de una solución de biftalato de potasio con la solución valorante de NaOH.

2.2.4.1. Cuantificación de los Grupos Sulfato

El procedimiento consistió en introducir una cantidad de látex limpio que represente 0.1 g de polímero en un recipiente con agitación magnética, y se llevó a un volumen final de 150 mL con agua DDI. A continuación, se adicionó 100 μL de HCl 1M para asegurar la protonación total de los grupos sulfato presentes en la superficie de las partículas, y se realizó la valoración.

La Fig. 2.8 muestra la curva de valoración conductimétrica de los grupos SO_4^{2-} superficiales correspondiente al látex de PS (S4). Los grupos sulfato poseen un carácter ácido fuerte y generan una pendiente muy negativa en las curvas de valoración conductimétrica. A medida que se añade NaOH, los protones que actúan como contraiones de los grupos sulfato superficiales, son progresivamente intercambiados por contraiones Na^+ . Los H^+ y OH^- se unen para formar agua, lo que disminuye la conductividad hasta llegar al punto final de valoración. Esta disminución en la conductividad origina la fuerte pendiente negativa del primer tramo de la curva. Luego del punto final de valoración, la pendiente aumenta por el exceso de NaOH. Debe tenerse en cuenta que el NaOH consumido en el punto de equivalencia no sólo corresponde a la valoración de los grupos sulfato, sino también a la neutralización del HCl previamente agregado.

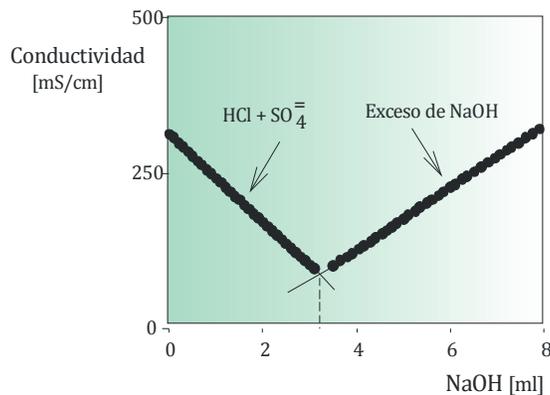


Figura 2.8. Valoración conductimétrica del látex de PS S4 para la determinación de grupos sulfato superficiales.

2.2.4.2. Cuantificación de los Grupos Carboxilos

El látex carboxilado R2, presenta en su superficie grupos sulfato originados por el iniciador y grupos carboxilos provenientes del AMA. Los grupos sulfato poseen un carácter ácido fuerte, mientras que el ácido carboxílico es débil.

El procedimiento es similar al reportado en el punto anterior, pero en este caso, el HCl adicionado permitiría asegurar la protonación tanto de los grupos ácidos sulfato como de los grupos carboxilo presentes en la superficie de las partículas.

En la Fig. 2.9 se presenta la curva de valoración conductimétrica correspondiente, donde se observan tres tramos con diferentes pendientes. El primer tramo se comporta como un ácido fuerte, y corresponde a los grupos sulfato y al HCl adicionado. El segundo tramo pertenece a los grupos ácido débil (carboxilo), y el tercer tramo al exceso de NaOH. La pendiente de valoración del ácido débil es diferente a la del ácido fuerte porque en el primer caso los protones están menos dissociados que en el segundo. Así, el intercambio de protones por contraiones Na^+ de la disolución de NaOH se refleja con un ligero aumento en la conductividad.

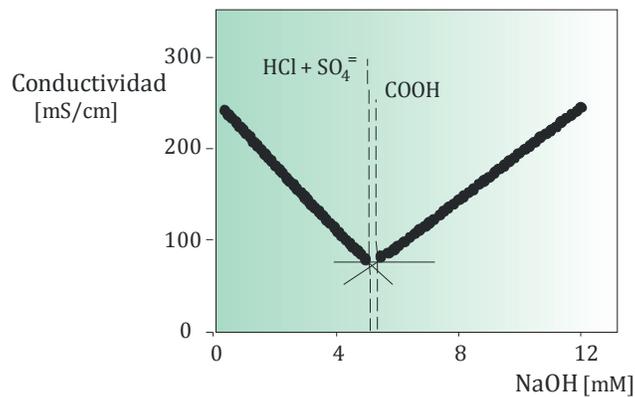


Figura 2.9. Valoración conductimétrica del látex tipo “core-shell” R2 para la determinación de los grupos sulfato y carboxilo superficiales.

2.2.4.4. Cuantificación de los Grupos Acetal

Los látex con funcionalidad acetal (A1 y A2) presentan en su superficie grupos sulfatos provenientes del iniciador, y grupos acetal provenientes del ADEA.

Los grupos acetal antes de ser valorados se transformaron en grupos aldehído. Esta transformación se llevó a cabo acidificando el medio a pH 2 mediante la adición de una disolución de HCl 1M y manteniendo estas condiciones durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez convertidos los grupos acetal en aldehído, éstos se determinaron mediante un método de valoración indirecto (Yan *et al.*, 1990). En una primera etapa, la muestra de látex se trató con 0,35 mL de una disolución acuosa de clorhidrato de hidroxilamina (Aldrich) al 2% en peso, y se mantuvo durante 20 minutos a temperatura ambiente y bajo agitación suave. El clorhidrato reacciona mol a mol con los grupos aldehído para dar un mol de HCl, un mol de oxima y un mol de agua (Fig. 2.10). En una segunda etapa, el HCl desprendido se valoró conductimétricamente con una solución de NaOH de concentración conocida.

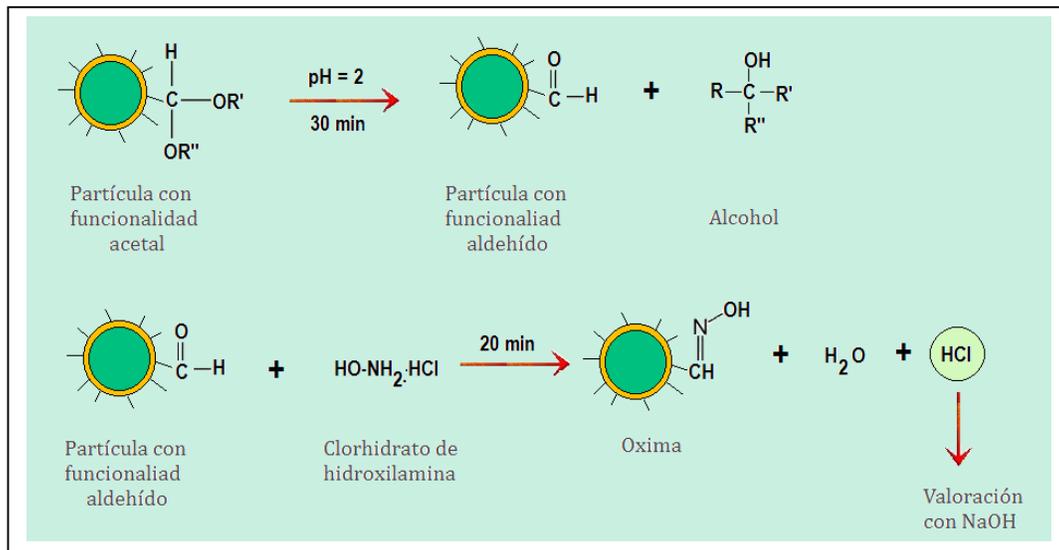


Figura 2.10. Esquema de las reacciones involucradas en la valoración de los grupos funcionales acetal.

Antes de hacer reaccionar el clorhidrato de hidroxilamina con los grupos aldehído, se valoró una solución de este reactivo con el objeto de ver la forma y evolución de la curva. En la Fig. 2.11 se muestra la valoración conductimétrica de la disolución de clorhidrato de hidroxilamina 0,3 N con NaOH. El primer tramo de la curva no presenta una pendiente negativa muy pronunciada, lo que indica que el HCl presente en el reactivo no se encuentra libre y, por lo tanto sólo se libera HCl cuando el clorhidrato de hidroxilamina reacciona con los grupos aldehído.

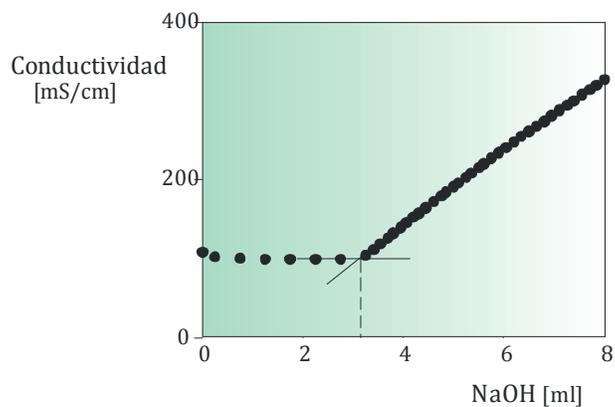


Figura 2.11. Valoración conductimétrica de la disolución de clorhidrato del hidroxilamina con NaOH.

En la Fig. 2.12 se representa la curva de valoración de los grupos aldehídos superficiales, donde se pueden observar 3 tramos bien definidos. La pendiente negativa inicial es debida a los grupos SO_4^{2-} y al HCl desprendido de la reacción del clorhidrato de hidroxilamina con los grupos aldehído. Restando los grupos SO_4^{2-} , determinados previamente, se obtienen los grupos aldehído. El segundo tramo de la curva corresponde al exceso de clorhidrato de hidroxilamina y el tercero al exceso de NaOH.

En la Tabla 2.5, se presentan los valores estimados para la densidad de carga superficial σ ($\mu\text{C}/\text{cm}^2$), y de grupos sulfato, carboxilo y acetal (δ_{SO_4} ; δ_{COOH} ; $\delta_{\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2}$ mEq/ cm^2) presentes en la superficie de las partículas de los cuatro látex analizados. Para calcular el área de las partículas, se supuso a la población como

monodispersa, de diámetro igual al D_{DLS} a 90° , y de densidad ρ igual a la del PS (1.04 g/cm³). La mayor densidad de grupos funcionales en el látex A2 respecto del A1, se debe a la mayor composición de monómero de funcionalización utilizada (ver Tabla 2.3) y a que se alcanzó una mayor conversión, en una copolimerización donde la composición de ADEA tiende a aumentar a lo largo de la reacción.

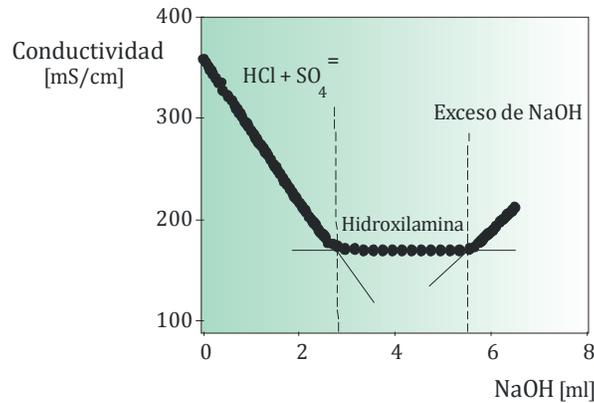


Figura 2.12. Valoración conductimétrica del látex tipo “core-shell” A1, para la determinación de los grupos acetal superficiales.

Tabla 2.5. Densidad de carga superficial y densidad de grupos funcionales obtenidas mediante valoraciones conductimétricas de los látex estudiados.

Látex	σ ($\mu\text{C}/\text{cm}^2$)	δ_{SO_4} (mEq/cm ²)	δ_{COOH} (mEq/cm ²)	$\delta_{\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2}$ (mEq/cm ²)
S4	16,22	$1,68 \times 10^{-7}$	-	-
R2	78,40	$1,67 \times 10^{-7}$	$7,95 \times 10^{-7}$	-
A1	24,56	$2,22 \times 10^{-7}$	-	$3,21 \times 10^{-8}$
A2	26,77	$2,14 \times 10^{-7}$	-	$6,28 \times 10^{-8}$

2.2.5. Estabilidad Coloidal

Se estudió la estabilidad coloidal de los látex frente al aumento de la fuerza iónica del medio, determinándose la *c.c.c.* en términos de la concentración mínima de KBr requerida para la agregación de las partículas. A tal efecto, se preparó una solución patrón de KBr a partir de la droga sólida y en base a ella se realizaron una serie de diluciones para obtener las distintas concentraciones deseadas de electrolito (de 0 a 800 mM). El paso siguiente fue preparar una serie de tubos conteniendo 1 mL de látex de concentración

0.013 mg/mL y 1 mL de solución de KBr a diferentes concentraciones. Los tubos se dejaron 24 h en estufa a 37 °C, tapados y sin agitación, y luego se observó la existencia o no de coagulación a través del método visual y de DLS a 90°. Además, para estudiar la influencia del pH del medio sobre la estabilidad coloidal del látex R2, se trabajó a dos pH diferentes (6.0 y 8.0).

En la Tabla 2.6, se presentan los resultados de la *c.c.c.* para los diferentes látex estudiados. En la Fig. 2.13 se muestra la evolución de los D_{DLS} de los látex A1 y A2 al aumentar la concentración de KBr a pH 8. Se consideró alcanzada la *c.c.c.* cuando el diámetro medido se incrementó en un 10% respecto al de la partícula en agua deionizada.

Tabla 2.6. Valores de la *c.c.c.* determinados visualmente y por DLS a 90° (a 2 pH diferentes) para los cuatro látex sintetizados.

Látex	Funcionalidad	<i>c.c.c.</i> (mM) a pH=6		<i>c.c.c.</i> (mM) a pH=8	
		Método Visual	DLS	Método Visual	DLS
S4	SO ₄ ²⁻	250	75	250	75
R2	COOH	450	200	900	300
A1	CH(OR) ₂	-	-	250	150
A2	CH(OR) ₂	-	-	225	150

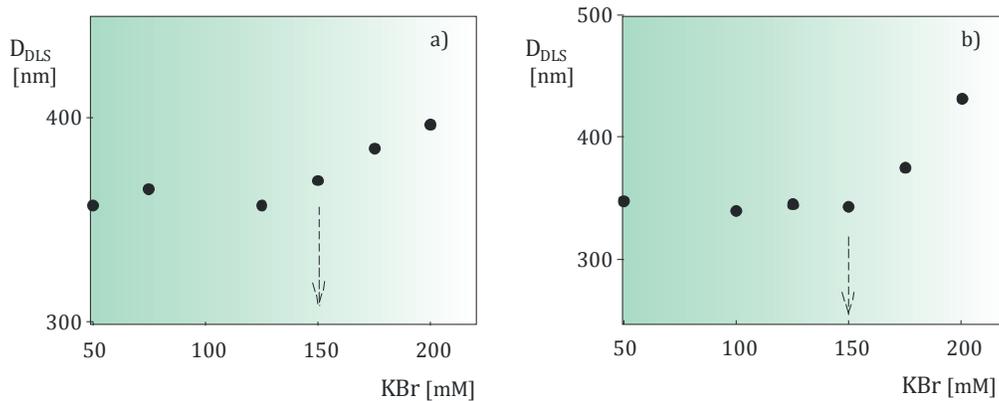


Figura 2.13. Determinación de la *c.c.c.* a pH 8 por DLS a 90°. a) látex A1; b) látex A2.

En general, las *c.c.c.* obtenidas por el método visual resultaron mucho mayores que las determinadas por DLS a 90° en iguales condiciones, corroborando la mayor

sensibilidad y la ausencia de subjetividad de los métodos instrumentales en la detección de la agregación de las partículas coloidales.

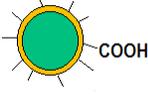
Debido a que tanto en el látex de PS (S4) como en los látex con funcionalidad acetal (A1 y A2) la estabilidad (debida a la densidad de carga superficial) está proporcionada por los grupos sulfato superficiales provenientes del iniciador, la *c.c.c.* es poco dependiente del pH del medio, ya que los grupos sulfato se encuentran desprotonados tanto a pH 6 como a pH 8. Si bien la *c.c.c.* del látex S4 se determinó a ambos pH a fin de corroborar lo antes expuesto, la *c.c.c.* de los látex con funcionalidad acetal se determinó sólo a pH 8, que corresponde a la condición en que se realizarán los ensayos de inmunoaglutinación.

En los látex núcleo-coraza con funcionalidad carboxilo, el pH influye en la estabilidad coloidal. En medio básico los grupos carboxilos no están protonados y poseen carga negativa, pero a medida que se acidifica el medio, éstos comienzan a protonarse y por lo tanto disminuye su carga. En medio básico y como consecuencia de la elevada carga superficial negativa que poseen las partículas de látex, la doble capa eléctrica se encuentra más extendida que en medio ácido, y entonces se necesita una mayor concentración de electrolito para reducirla y conseguir la coagulación de las partículas. En consecuencia la *c.c.c.* resulta mayor.

El látex R2 presentó gran estabilidad a pH 8, mostrando valores de *c.c.c.* mayores que a pH 6, tanto por DLS como por método visual.

En la Tabla 2.7 se resumen las principales características de los látex que serán utilizados para el acoplamiento de proteínas en el Capítulo 4.

Tabla 2. 7. Principales características de los látex a utilizar en la etapa de sensibilización con proteínas.

	Látex			
	S4	R2	A1	A2
				
Morfología	Homogénea	Core-Shell	Core-Shell	Core-Shell
Funcionalidad	SO ₄ ²⁻	COOH	CH(OR) ₂	CH(OR) ₂
<i>D</i> _{DLS} [nm]	300	373	330	336
Polidispersidad	1,0091	1,0044	1,0089	1,0416
σ [μC/cm ²]	14,9	78,40	24,56	26,77
δ _{SO4} [mEq/cm ²]	-	1,76×10 ⁻⁸	2,22×10 ⁻⁷	2,14×10 ⁻⁷
δ _{COOH} [mEq/cm ²]	-	7,95×10 ⁻⁷	-	-
δ _{CH(OR)2} [mEq/cm ²]	-	-	3,21×10 ⁻⁸	6,28×10 ⁻⁸
<i>c.c.c.</i> visual pH 8 [mM]	250	900	250	225
<i>c.c.c.</i> por DLS pH 8 [mM]	75	300	150	150

2.3. CONCLUSIONES

En la primera parte de este capítulo se presentó la síntesis de coloides poliméricos con funcionalidad carboxilo y acetal mediante un proceso de polimerización en emulsión en dos etapas. En una primera etapa, se prepararon los núcleos o siembras de PS; y en una segunda etapa sobre estas siembras de PS se formaron las cortezas con funcionalidad carboxilo o acetal, generando así partículas con morfología “core-shell”. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Para el látex de PS (S4) la conversión se mantuvo prácticamente constante después de 4 h de reacción; con un valor final de 71%; y un *D*_{DLS} de 300 nm.
- Para el látex carboxilado R2 se obtuvo una conversión final de 88%, con un crecimiento del diámetro de partícula, respecto de la siembra, de 73 nm. Además, el

agregado impulsional del AMA, permitió aumentar la densidad superficial de grupos carboxilo respecto de la que se hubiera obtenido bajo operación “batch”.

- Para los látex acetal A1 y A2, los dos experimentos “batch” realizados produjeron una conversión final menor del 30% y un incremento del diámetro de partícula, respecto al de la siembra, inferior a los 50 nm.

Luego de sintetizar y limpiar los látex, estos fueron caracterizados observándose lo siguiente:

- En todos los casos, se lograron sintetizar látex con la monodispersidad de tamaños requerida para ser utilizados en test de inmunodiagnóstico.

- Los D_{DLS} y D_T resultaron mayores a los D_{SEM} , debido a que en microscopía se mide el diámetro de las partículas secas, mientras que en DLS y T se determina el diámetro hidrodinámico de las mismas.

- Los látex tipo “core-shell” presentaron grupos sulfato, carboxilo y acetal proporcionados por el iniciador y los monómeros de funcionalización (AMA y ADEA respectivamente). De los grupos superficiales detectados, sólo los grupos sulfato y carboxilo le proporcionaron estabilidad a las partículas de látex.

- Las *c.c.c.* obtenidas por el método visual resultaron mucho mayores que las determinadas por DLS a 90° en iguales condiciones, corroborando la mayor sensibilidad y la ausencia de subjetividad de los métodos instrumentales en la detección de la agregación de las partículas coloidales.

- Para el látex de PS (S4) y para los látex con funcionalidad acetal (A1 y A2), la *c.c.c.* es poco dependiente del pH del medio debido a que la estabilidad, proporcionada por la

densidad de carga superficial, esta dada por los grupos sulfato superficiales provenientes del iniciador, que se encuentran desprotonados tanto a pH 6 como a pH 8.

- En el látex R2, la *c.c.c.* es dependiente del pH del medio debido al carácter ácido débil de los grupos carboxilo. Este látex presentó gran estabilidad, mostrando valores de *c.c.c.* a pH 8 mayores que a pH 6, tanto por DLS como por el método visual.

En base a los resultados obtenidos, se podría decir que los látex R2, A1 y A2 son “a priori” aptos para su sensibilización con proteínas, mediante unión covalente de los grupos carboxilo y acetal presentes en la superficie de las partículas con los grupos amino de las proteínas antigénicas del *T. cruzi*.

CAPITULO 3:

EXPRESIÓN DE LAS PROTEINAS UTILIZADAS

3.1. INTRODUCCION

La búsqueda de anticuerpos en el suero contra componentes del *T. cruzi* ha sido uno de los más importantes pilares del diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. La mayoría de los métodos serológicos están basados en el uso de proteínas del extracto completo del *T. cruzi*, en el estadio epimastigote. Como consecuencia, dada la complejidad de los extractos, resulta muy dificultosa la estandarización ya que presentan una considerable variación en la reproductibilidad y confiabilidad de los resultados.

La ocurrencia de reacciones falso-positivas ha sido un problema persistente en los tests de diagnóstico serológicos de la Enfermedad de Chagas (Cattand y De Raadt, 1991; Freilij *et al.*, 1994), ya que se ha observado reacción cruzada con pacientes con Leishmaniasis, con infección con *Trypanosoma rangeli* (Levitus *et al.*, 1991; Soto *et al.*, 1996), Sífilis o Fiebre Reumatoidea (Guhl *et al.*, 1987; Greig *et al.*, 1990; Coura *et al.*, 1996). Esta situación, atribuida a una falta de conocimiento acerca de la composición de los Ag utilizados, así como también a la inmunogenicidad del *T. cruzi* en humanos (Stolf, 1992), representa un gasto enorme de muestras y recursos, lo cual podría ser evitado de realizar un ensayo certero sobre las muestras (Carvalho *et al.*, 1993). Por otro lado, el uso de una mezcla compleja de antígenos, no permite la detección de variaciones en las especificidades de los anticuerpos en las infecciones agudas, crónicas y congénitas.

La utilización de material parasitario definido, es claramente un requisito para

mejorar el serodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas, permitiendo al mismo tiempo un aumento de la especificidad de las reacciones utilizadas.

Los Ag recombinantes del *T. cruzi* constituyen una herramienta valiosa para su uso como elemento de reconocimiento en los métodos serológicos para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas, ya que pueden ser producidos en grandes cantidades, con una alta pureza y calidad estandarizada (da Silveira, 2001).

La sustitución de los antígenos nativos por antígenos recombinantes del *T. cruzi* en inmunoensayos además de tener ventajas en términos de la definición química de los antígenos (Carvalho *et al.*, 1993) y del costo de producción, podría resolver el problema de la especificidad manteniendo una alta sensibilidad (Frasch *et al.*, 1990, Moncayo, 1990; Levin *et al.*, 1991; Tanowitz *et al.*, 1992), ya que permite eliminar los problemas de reacciones cruzadas, que originan falsos positivos.

Se ha reportado un número considerable de secuencias de ADN codificantes de proteínas que son específicamente reconocidas por sueros de pacientes infectados con *T. cruzi*. En muchos casos estas proteínas han sido evaluadas en ensayos de diagnóstico (Engmen *et al.*, 1989; Cotrim *et al.*, 1990; Frasch y Reyes, 1990; Levin *et al.*, 1991; Burns *et al.*, 1992, Krieger *et al.*, 1992; Gruber *et al.*, 1993; Carvalho *et al.*, 1993; Gruber y Zingalles, 1993; Tibbetts *et al.*, 1994; Godsel *et al.*, 1995; Lorca *et al.*, 1995; Krautz *et al.*, 1998). Sin embargo, ninguna de ellas fueron antígenos capaces de ser reconocidos por todos los sueros humanos chagásicos.

Para solucionar este inconveniente, se ha recurrido al uso de proteínas recombinantes quiméricas, que expresan varios determinantes antigénicos no relacionados. La fusión de secuencias de ADN que codifican regiones específicas de proteínas antigénicas es una herramienta poderosa para la síntesis de proteínas quiméricas a ser usadas en diseño de pruebas de diagnóstico. La estrategia se basa en la

elección de epítopes inmunodominantes dentro de los Ag enteros y su posterior ensamblaje; lo que permite contemplar la sensibilidad de ambas moléculas sin perder la especificidad que brindan los fragmentos (Hungton *et al.*, 2000; da Silveira *et al.*, 2001).

El uso de proteínas multiepítope, en lugar de mezclas de antígenos recombinantes, presenta varias ventajas. Así por ejemplo, se reducen los pasos de purificación, ya que para producir quimeras multiepítope se requiere la purificación de una sola proteína, lo que disminuye considerablemente los costos de producción en comparación a la purificación de varias proteínas simples. El empleo de proteínas quiméricas permite también igualar el número de epítopes que participan en el inmunoensayo, y de esta manera se eliminan los problemas de competición que existen habitualmente entre los distintos antígenos por la adsorción/inmovilización. De esta manera, se facilita la estandarización en la producción de los reactivos.

Además, la mezcla de péptidos puede disminuir la antigenicidad individual de los antígenos una vez adsorbidos en fase sólida, debido a la obstrucción de los sitios antigénicos. En cambio, cuando la sensibilización se realiza con construcciones quiméricas, la proteína puede unirse a la fase sólida a través de algunos sitios antigénicos, dejando el resto de la molécula disponible para reaccionar libremente. Por lo tanto, aún cuando un epítope fuera bloqueado, otros epítopes todavía quedarían expuestos para interactuar con anticuerpos, lo que mejoraría la sensibilidad de la prueba.

En este trabajo se utilizarán distintas proteínas antigénicas del *T. cruzi*. Se trabajará con el Homogenato soluble del parásito, que está constituido por una mezcla de proteínas, y con varias proteínas recombinantes. Entre estas últimas se encuentran: i) Ag36, producida y donada por Wiener Laboratory (Argentina); ii) FRA (flagelar repetitive antigen); y iii) CP1 (proteína quimérica), formada por la expresión de tandem de los péptidos FRA y SAPA (shed acute-phase antigen), altamente antigénicos y específicos del

T. cruzi. Las proteínas FRA y CP1 fueron sintetizadas durante el desarrollo de esta Tesis, como se describe más adelante.

Ag36 presenta una estructura repetitiva compuesta por 38 aminoácidos codificados por una secuencia de 114 pares de bases. Anticuerpos contra la proteína recombinante reconocen una banda del citoesqueleto del parásito de 110 kDa ya sea en la etapa aguda o crónica de la enfermedad.

FRA es un antígeno repetitivo de aproximadamente 30 kDa, presente en epimastigotes, tripomastigotes y tripomastigotes metacíclico. El gen que lo codifica, se expresa en todos los estadios de desarrollo y cepas del *T. cruzi*, y presenta una estructura altamente conservada. FRA ha resultado ser uno de los péptidos más antigénicos del *T. cruzi*, además de mostrar alta especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de la enfermedad en su etapa crónica.

Esta molécula, que es altamente sensible y específica, fue considerada muy adecuada para su incorporación en la molécula quimérica (CP1) junto con la fracción SAPA, la cual es altamente antigénica durante la fase aguda de la enfermedad, pudiendo detectarse anticuerpos anti-SAPA tan tempranamente como al día 7 post-infección; mientras que en pacientes crónicos, estos alcanzan bajos valores. SAPA constituye un antígeno confiable para el diagnóstico temprano, así como también para la discriminación entre distintos estadios de la enfermedad.

La utilización de la proteína quimérica CP1, sobre la base de los antígenos FRA y SAPA, permite complementar la sensibilidad de ambas moléculas sin perder la especificidad que brindan los fragmentos. La secuencia de nucleótidos del gen que se codifica para la proteína CP1 presenta dominios altamente conservados entre diferentes cepas del *T. cruzi*, lo que sugiere la existencia de una alta concentración de anticuerpos

específicos contra estas repeticiones en el suero de pacientes infectados y una alta afinidad en la unión antígeno-anticuerpo.

El objetivo de este capítulo es la obtención del Homogenato del *T. cruzi*; y la expresión, purificación y caracterización de distintas proteínas recombinantes, para su posterior utilización en la formación de complejos látex-proteína. La utilización de proteínas recombinantes del *T.cruzi* se realiza con dos propósitos bien establecidos: a) eliminar las reacciones cruzadas con otras enfermedades que se observan cuando se emplea el Homogenato del *T.cruzi*; y b) evitar el difícil y costoso proceso de purificación de proteínas a partir de un extracto del parásito.

3.2. TRABAJO EXPERIMENTAL

3.2.1. Materiales

3.2.1.1. Soluciones

- *PBS*: NaCl 0,137 M; KCl 0,0027 M; Na₂HPO₄ 0,01 M; KH₂PO₄ 0,0018 M (pH 7,4).
- *PBS-Tween*: PBS; Tween 20 0,01% v/v.
- *Buffer de muestra para SDS-PAGE*: Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8); glicerol 20% v/v; dodecil sulfato de sodio (SDS) 4% p/v; mercaptoetanol 5% v/v; azul de bromofenol 0,2% p/v.
- *Gel de apilamiento para SDS-PAGE*: Tris 0,13 M (pH 6,8); SDS 0,05%; acrilamida 12% p/v; bisacrilamida 0,32% p/v; N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) 0,1% v/v; persulfato de amonio (APS) 0,05% p/v.
- *Gel de separación para SDS-PAGE*: Tris 0,375 M (pH 8,8); SDS 0,1%; acrilamida 12% p/v; bisacrilamida 0,32% p/v; glicerol 10% v/v; TEMED 0,06% v/v; APS 0,05% p/v.

- *Buffer de corrida para SDS-PAGE*: Tris 0,025 M; glicina 0,192 M; SDS 0,1% (pH 8,3).
- *Solución de tinción para geles SDS-PAGE*: azul de Coomassie G-250 0,5%; metanol 45%; ácido acético 10%.
- *Solución decolorante para geles SDS-PAGE*: etanol 45% v/v; ácido acético 10% v/v.
- *Buffer carbonato para ensayos de ELISA*: Na_2CO_3 15 mM; NaHCO_3 35 mM; NaN_3 3,1 mM (pH 9,6).
- *Buffer de resuspensión*: Na_2HPO_4 50 mM (pH 8); NaCl 300 mM.
- *Solución de lavado para columna de Ni^{2+}* : Na_2HPO_4 50 mM (pH 8); NaCl 300 mM; Imidazol 20 mM.
- Soluciones para la purificación en columna de Ni^{2+} :
 - *BL1*: Na_2HPO_4 50 mM (pH 8); NaCl 300 mM; Imidazol 50 mM
 - *BL2*: Na_2HPO_4 50 mM (pH 8); NaCl 300 mM; Imidazol 100 mM
 - *BL3*: Na_2HPO_4 50 mM (pH 8); NaCl 300 mM; Imidazol 250 mM
 - *BL4*: Na_2HPO_4 50 mM (pH 8); NaCl 300 mM; Imidazol 500 mM

3.2.1.2. Medios de cultivo

- *Caldo Luria-Bertani (LB)*: peptona 1%; extracto de levadura 0,5%; NaCl 1% (pH 7,5).
- *Medio para el crecimiento de E. coli*: caldo LB suplementado con ampicilina o kanamicina 0,1 mg/mL; maltosa 0,02%; MgSO_4 10 mM.

3.2.2. Obtención del Homogenato del *T. cruzi*

Trypanosoma cruzi se caracteriza por ser un parásito con una gran variabilidad antigénica y muchos de sus componentes forman parte de la interacción del protozooario con el medio. Durante todo el proceso de morfogénesis, sus moléculas de membrana cambian constantemente y por lo tanto su genotipo, lo que demuestra una alta complejidad biológica. Desde el punto de vista antigénico se han observado diferencias en cuanto al contenido y cantidad de antígenos en todos los estadios del desarrollo del parásito, no obstante existen antígenos dominantes comunes entre ellos que determinan la respuesta en el huésped.

El Homogenato total del *T. cruzi* se obtuvo a partir de un cultivo in vitro del parásito en el estadio de epimastigote. Se mezcló 1 volumen de masa húmeda de parásito con 10 volúmenes de agua destilada, y luego se sonicó por 2 minutos a 400 W con un procesador ultrasónico de alta intensidad marca Sonics para provocar la lisis del parásito. Los restos celulares se separaron de la mezcla de proteínas antigénicas mediante centrifugación, utilizando una centrífuga refrigerada Beckman Coulter.

3.2.3. Obtención de las Proteínas Recombinantes

La amplificación del gen que codifica las proteínas recombinantes FRA y CP1 (FRA-SAPA) mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), el clonado en los vectores plasmídicos pET-32a y pET24a (Fig. 3.1) y la transformación de células de *E. coli* BL21, fue realizado por personal del Laboratorio de Tecnología Inmunológica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Litoral) a cargo del Dr. Ivan Marcipar.

En esta Tesis se trabajó con las bacterias transformadas, y se realizó la expresión y purificación de las proteínas recombinantes FRA y CP1 (FRA-SAPA), clonadas en los vectores pET32a y pET32a/pET24a respectivamente.

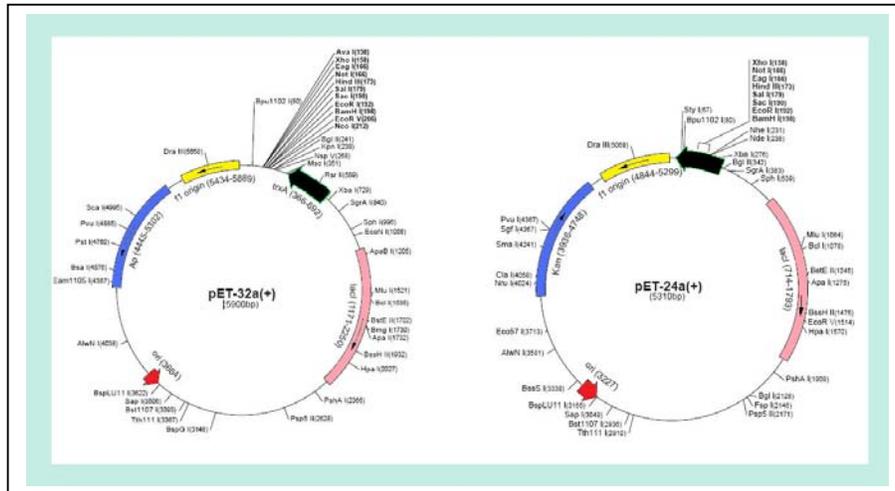


Figura 3.1. Vectores utilizados para la clonación de las proteínas recombinantes.

3.2.4. Expresión de las Proteínas Recombinantes

La expresión del gen recombinante puede ser inducida luego de que las células han alcanzado un estado metabólico tal que la expresión de un gen foráneo resulte lo menos tóxico posible para la célula. Para ello, es necesario hacer crecer bacterias en un medio de cultivo líquido suplementado con glucosa y el antibiótico para el cual el vector genere resistencia (ampicilina para pET32a y kanamicina para pET24a). La glucosa inhibe la expresión basal del gen foráneo durante el crecimiento de la célula, para evitar la posible toxicidad de la proteína recombinante sobre la célula, mientras que el antibiótico permite sólo el crecimiento de las bacterias transformadas.

El procedimiento consistió en hacer crecer “over-night” en agitación (180 r.p.m.) a 37°C las células de *E. coli* de la cepa BL21, conteniendo las distintas construcciones plasmídicas, en 5 mL de medio de cultivo LB suplementado con 0.1 mg/ml de ampicilina (pET32a) o kanamicina (pET24a).

Cuando la densidad óptica (DO) del medio de cultivo alcanzó un valor de 0.5-0.6 a 550 nm (DO₅₅₀), se agregó isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.5 mM para inducir la expresión génica, y se continuó incubando a

37°C por 3 h. Los controles negativos correspondientes se realizaron incubando cultivos similares en las mismas condiciones sin el agregado de IPTG. Las células se recogieron centrifugando a 4.500 r.p.m. durante 15 minutos, y se resuspendieron en buffer de resuspensión de células (PBS). La suspensión se sonicó hasta lisis total a 400 W, se centrifugó a 4.500 r.p.m. durante 10 minutos para separar los restos celulares, y se recolectó el sobrenadante que contiene las proteínas.

En la Fig. 3.2, se muestra un análisis por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, donde se presentan las proteínas expresadas por la bacteria durante su crecimiento (control negativo sin IPTG) y tras la inducción de la expresión génica con IPTG.

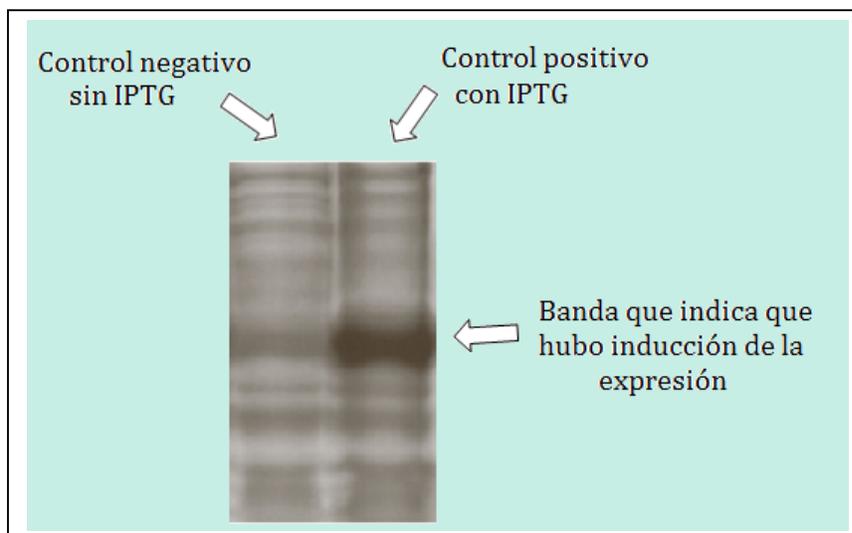


Figura 3.2. Imagen del gel de SDS-poliacrilamida de clones de *E. coli* transformados con el plásmido FRA-pET32a. En la primera calle se muestra la expresión basal de las proteínas de la bacteria, sin IPTG; en la segunda calle se muestra la expresión de la proteína FRA, como resultado del agregado de IPTG.

3.2.5. Purificación de las Proteínas Recombinantes

Porath *et al.* (1975) desarrollaron una técnica cromatográfica para bioseparaciones basada en la afinidad de proteínas por iones metálicos unidos a agentes quelantes inmovilizados sobre el soporte cromatográfico. La aplicación más conocida de

este método, denominado Cromatografía de Afinidad de Ion Metálico Inmovilizado (IMAC), es la separación de proteínas recombinantes (Lauritzen *et al.*, 1991; Nolson *et al.*, 1992; La Vaile *et al.*, 1993) debido a que se encuentran impurificadas con una mezcla de proteínas luego de la expresión.

Para utilizar IMAC, es necesario fusionar un hexapéptido de residuos de Histidina sobre el extremo N- o C- terminal de la proteína recombinante. Las moléculas con estas características son conocidas como proteínas "His-Tag" y su purificación mediante IMAC representa una estrategia muy útil, especialmente cuando es esencial un máximo rendimiento en la producción de la proteína de interés.

El principio de la IMAC es la formación de quelatos estables debido a la adsorción de los residuos de Histidina de las proteínas "His-Tag" y los cationes metálicos Ni^{2+} inmovilizados sobre una superficie de la resina en suspensión. Tras la unión específica, estas proteínas pueden ser desplazadas por competencia con moléculas de Imidazol mediante lavados con soluciones formuladas con cantidades crecientes de Imidazol (Fig. 3.3).

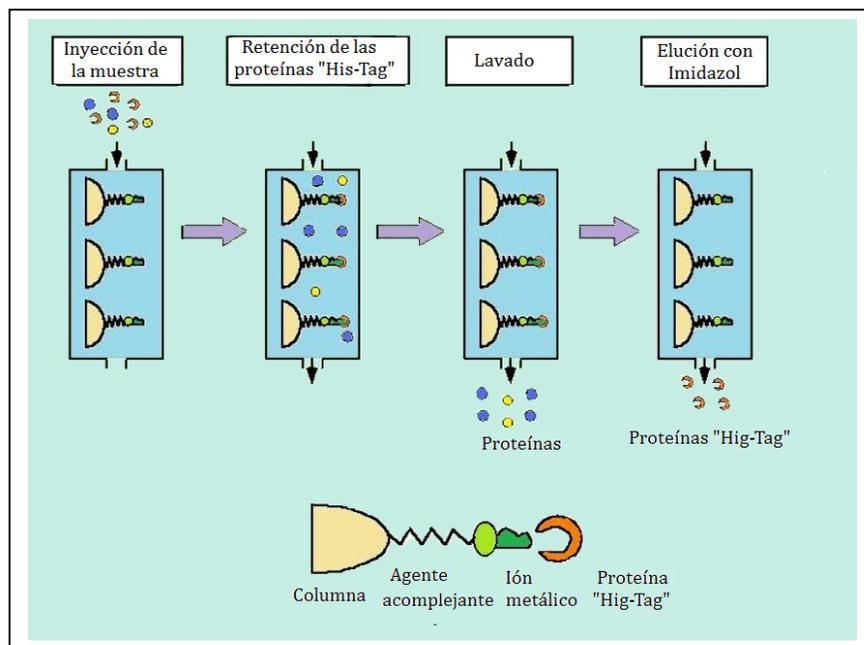


Figura 3.3. Proceso de purificación de las proteínas recombinantes en columnas de pseudoafinidad a níquel.

Se utilizó una columna de IDA-Sepharosa (Novagen, U.S.A.) de 1 ml y se utilizó el siguiente procedimiento: a) se lavó la columna con 10 volúmenes de una solución Imidazol 20 mM; b) se pasó a través de la columna la mezcla de proteínas, donde sólo se unen las proteínas “His-Tag”; c) se lavó la columna con 10 volúmenes de una solución Imidazol 20 mM para eliminar las proteínas no unidas; d) se realizó la elución de las proteínas unidas específicamente con las soluciones de BL1, BL2, BL3 y BL4. El análisis de la pureza y la cuantificación de las distintas proteínas recombinantes se realizó por SDS-PAGE al 15% (Laemmli, 1970), seguida de tinción con Azul de Coomassie.

3.2.6. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico. Para el análisis de mezclas de proteínas se utiliza como soporte un gel de poliacrilamida. Éste es un gel sintético, termoestable, transparente, resistente y relativamente inerte, que puede prepararse con un amplio rango de tamaños medios de poro (Rüchel *et al.*, 1978). El tamaño de poro de un gel está determinado por la concentración total presente de acrilamida y la cantidad del agente reticulador (bisacrilamida).

En este trabajo, las electroforesis fueron llevadas a cabo en geles con un 15% de acrilamida-bisacrilamida (29:1) en condiciones desnaturizantes (Laemmli, 1970). Este tipo de geles presentan dos zonas: a) una con tamaño de poro grande (gel de apilamiento), que es donde se siembran las muestras y cuya función es concentrar varias veces las proteínas; y b) otra con tamaño de poro chico (gel de resolución), que se encuentra por debajo del gel de apilamiento y es donde las proteínas se separan de acuerdo a su tamaño (Fig. 3.4).

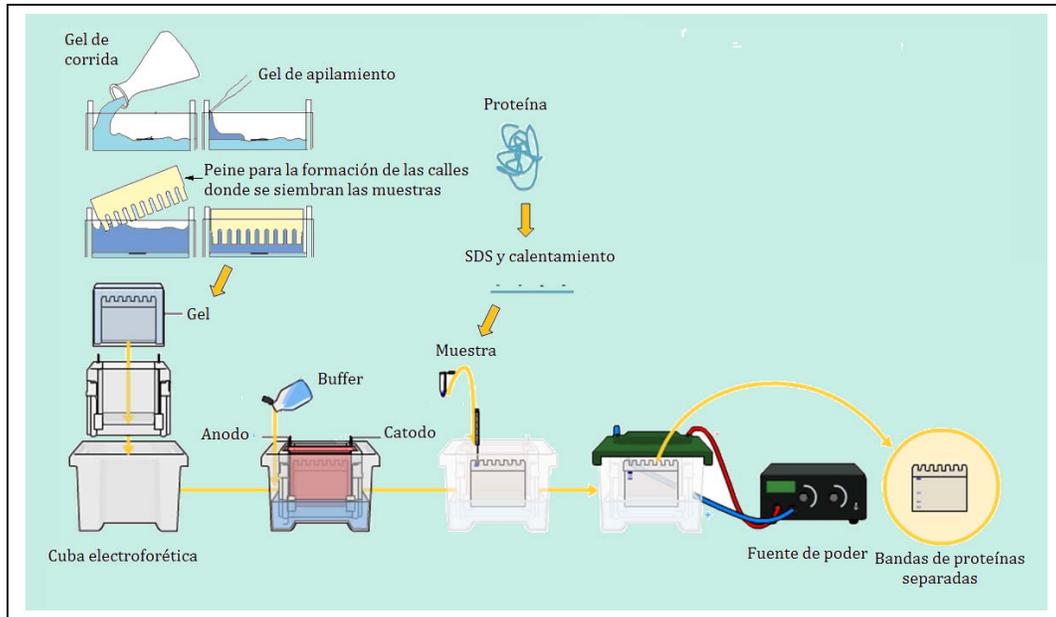


Figura 3.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

El gel de apilamiento fue preparado con un tampón de Tris-HCl de pH de 6,8, SDS, acrilamida-bisacrilamida (29:1), TEMED y APS. El APS genera radicales libres y es por ello un iniciador de la reacción de polimerización que finalmente forma el gel, mientras que el TEMED actúa como propagador. Las únicas diferencias en cuanto a la composición del gel de resolución respecto al de apilamiento es que el tampón Tris-HCl es de pH 8,8 y además contiene glicerol.

Las muestras fueron tratadas con 1 volumen de buffer de muestra, conteniendo Tris-HCl pH 6,8; glicerol; SDS; β -mercaptoetanol y azul de bromofenol, e incubadas en baño de agua a ebullición durante 5 minutos.

El Tris-HCl se utiliza como tampón porque es una sustancia inocua para la mayor parte de las proteínas; el glicerol, debido a su densidad, contribuye a que la muestra quede depositada en las calles sin dispersarse; el SDS desnaturaliza las proteínas, eliminando sus estructuras secundaria y terciaria sin alterar los enlaces disulfuro y confiere una carga negativa a cada proteína en proporción a su masa (Shapiro *et al.*, 1967;

Weber *et al.*, 1969; Laemmli, 1970) permitiendo un fraccionamiento que obedece únicamente al tamaño de la proteína desplegada (longitud de su cadena); el β -mercaptoetanol se utiliza para romper los enlaces disulfuro y asegurarse de que la proteína esté completamente desnaturalizada antes de ser cargada en el gel, y de ese modo garantizar que corre de manera uniforme; y el azul de bromofenol actúa como marcador de avance ya que, al ser una molécula pequeña, se adelanta a la mayor parte de las proteínas.

Para realizar la electroforesis, se sembraron 10 μ l de cada muestra en el gel de poliacrilamida y se aplicó una diferencia de potencial de 150 V. El buffer de corrida contiene Tris-HCl pH 8,3, glicina y SDS. La glicina se utiliza como fuente de iones lentos, porque la movilidad del glicinato es tal, que se puede situar en un valor inferior al de la proteína más lenta conocida con carga negativa neta para el intervalo de pH de trabajo.

La fijación y tinción de los geles se efectuó por inmersión en solución de azul de Coomansie G-250 debido a que se une a proteínas de modo inespecífico, y se decoloró en baño a ebullición.

3.2.7. Cuantificación de las Proteínas

La cuantificación de las proteínas obtenidas se realizó mediante un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), donde se siembra una curva de calibrado de la proteína modelo BSA junto con las fracciones de la proteína de interés obtenidas de la columna de purificación y cuya concentración se quiere determinar. Los geles fueron analizados utilizando el Software Gel-Pro Analyzer versión 3.1, que permite medir y automatizar los procesos de medida en distintos tipos de geles, relacionando la intensidad de la imagen (cantidad de pixel) con la concentración de la proteína sembrada.

En la Fig. 3.5, se muestran los resultados de purificación y cuantificación de la proteína FRA. En todos los casos, la mayor cantidad de proteína recombinante eluyó al

pasar las soluciones de Imidazol de 50, 100 y 250 mM, estando la proteína en alto grado de pureza.

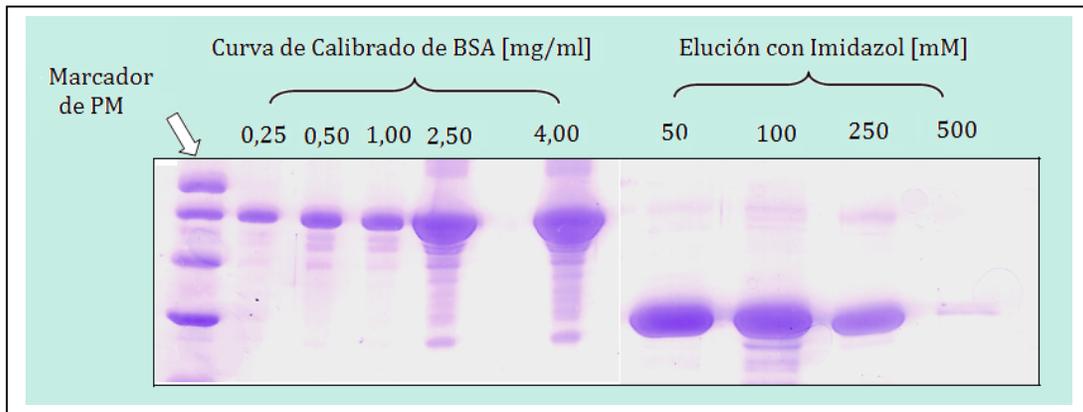
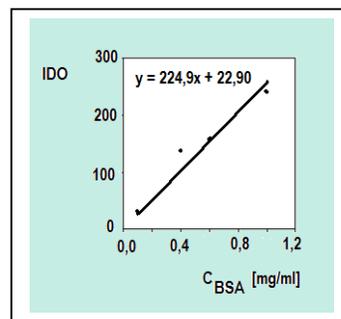


Figura 3.5. SDS-PAGE obtenido al sembrar las distintas fracciones recolectadas en la purificación de la proteína FRA junto con la curva de calibrado de la BSA.

Para el cálculo de la concentración de las muestras sembradas se construyó una curva de calibrado donde se graficó la intensidad de pixel obtenida (IDO) vs la concentración de BSA sembrada (CBSA). En la Fig. 3.6 se muestra el procedimiento para cuantificar la proteína CP1.

En la Tabla 3.1 se muestran las concentraciones obtenidas durante distintos procesos de purificación para las proteínas FRA (pET32a) y CP1 (pET24a).



$$IDO_{100 \text{ mM dil } 1/10} = 145,35$$

$$IDO_{250 \text{ mM}} = 163,55$$

$$y = 224,9x + 22,90 \Rightarrow (y - 22,90)/224,9 = x = C_{\text{PROT}}$$

$$C_{100 \text{ mM}} = 5,44 \text{ mg/mL}$$

$$C_{250 \text{ mM}} = 0,63 \text{ mg/mL}$$

Figura 3.6. Curva de calibrado de BSA y cuantificación de las fracciones eluidas con Imidazol 50, 100 y 250 mM obtenidas en el proceso de purificación de la proteína CP1.

Tabla 3.1 Concentraciones de las proteínas recombinantes (mg/mL) obtenidas en distintos procesos de purificación.

Proteína	Imidazol [mM]			
	50	100	250	500
FRA	4,56	3,58	1,64	-
	-	2,50	-	-
CP1	-	4,22	0,68	0,13
	-	2,22	0,79	0,35
	-	6,00	0,78	-
	-	5,44	0,63	-

3.2.8. Evaluación de la Antigenicidad de las Proteínas Recombinantes

Para que las proteínas recombinantes CP1 y FRA puedan ser aplicadas en el desarrollo de un test de inmunodiagnóstico para la Enfermedad de Chagas, se debe comprobar que éstas mantengan su actividad biológica como antígenos. Para ello, se realizaron ensayos de ELISA (Fig. 3.7), sensibilizando los pocillos con dichas proteínas y enfrentándolos a sueros controles positivos (individuos infectados con *T. cruzi*) y negativos (individuos no infectados).

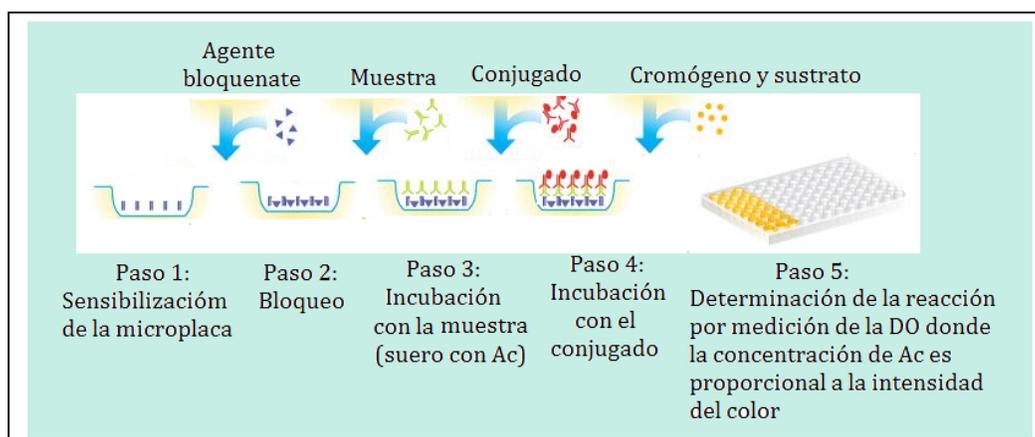


Figura 3.7. Procedimiento para determinar la actividad biológica de las proteínas recombinantes mediante ELISA.

Para realizar el ensayo de ELISA, se realizó el siguiente procedimiento: a) las policubetas de microtitulación (Costar, EE.UU) fueron sensibilizadas mediante el agregado de 0,5 µg/pocillo del antígeno recombinante en buffer carbonato pH 9,6; b) los sitios hidrofóbicos se bloquearon con una solución PBS-leche descremada 5%; c) se adicionaron

las muestras de suero diluidas 1/100 con PBS-leche descremada 1%; d) se agregó el conjugado, compuesto por anticuerpos anti-IgG bovina marcados con peroxidasa de rábano (Sigma Chemical Company, EE.UU) en PBS; e) se agregó el revelador, que consiste en una mezcla del sustrato enzimático y el cromógeno (H_2O_2 / 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, TMBS) (RDI, USA); f) la reacción de color fue bloqueada luego de 15 minutos con H_2SO_4 0.5N. Entre cada una de las etapas, se realizaron incubaciones a 37°C por 60 minutos; posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0,05%. Las lecturas se efectuaron a 450 nm en lector de ELISA.

Se observó que los sueros de pacientes no infectados no mostraron ninguna reacción, mientras que los sueros de los pacientes chagásicos mostraron una reacción positiva con ambos antígenos. De esta manera, se comprobó que las proteínas obtenidas mediante la tecnología del ADN recombinante tienen actividad específica como antígenos, ya que reaccionan sólo con los anticuerpos provenientes de sueros de pacientes chagásicos. Por lo tanto, pueden ser empleadas en el desarrollo de un test de inmunoaglutinación con potenciales aplicaciones en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.

3.2.9. Caracterización de las Proteínas Utilizadas

Las proteínas utilizadas fueron caracterizadas a partir de su secuencia de aminoácidos (aa) utilizando distintos software informáticos.

Para obtener el pI teórico, el número de aa y el peso molecular (PM) se utilizó el programa ExPASy ProtParam Tool. Estas características son útiles si se desea conocer en forma aproximada la región donde se puede encontrar una proteína en un gel de poliacrilamida.

El pI se calcula utilizando los valores de pK de los aminoácidos reportados en Bjellqvist *et al.* (1993, 1994), obtenidos a partir de la migración del polipéptido en un gel

con gradiente de pH desde 4.5 a 7.3 en un medio con urea 9,2 M y 9,8 M a 15 °C o 25 °C. Sin embargo, la capacidad buffer de una proteína puede afectar la precisión con la que se calcula el pI. Así, proteínas con una capacidad buffer pobre presentan mayor error en la predicción (Bjellqvist *et al.*, 1993; 1994).

El PM de la proteína se calcula mediante la adición de masas isotópicas medias de aminoácidos y la masa isotópica media de una molécula de agua. El programa, sin embargo, no tiene en cuenta las modificaciones pos-traduccionales, por lo que las proteínas que sufren esta clase de modificaciones, pueden migrar a una posición muy diferente de la prevista en un gel.

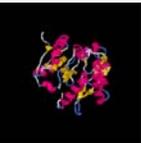
Como la función biológica de una molécula de proteína es determinada por su estructura, la cual indica cómo interactúa con los ligandos u otras moléculas de proteínas (López *et al.*, 2007), una de las motivaciones más comunes a la hora de predecir la estructura de una proteína, es usar dicha información para entender su función biológica. La estructura se estimó utilizando el servidor I-TASSER perteneciente al Centro de Medicina Computacional y Bioinformática de la Universidad de Michigan que se basa en la homología de secuencia.

I-TASSER, realiza un procedimiento bioinformático donde se produce la identificación de la proteína de interés a partir de bases de datos a partir de proteínas que tienen una estructura o motivo estructural similar a la secuencia de la proteína de la consulta. Se crea un perfil de la misma sobre la base de alineamiento múltiple de secuencias homólogas, que también se utiliza para predecir la estructura secundaria. Para mejorar la eficiencia, el software adopta un modelo que representa a la cadena proteica con cada residuo descrito por su átomo C α y el centro de masa de la cadena lateral. El ensamblado de los fragmentos se lleva a cabo ejecutando varias simulaciones en paralelo (Zhang *et al.*, 2002) a diferentes temperaturas, donde las barreras de energía siguen una función hiperbólica para acelerar las simulaciones entre niveles de energía diferentes. La

simulación esta basada en conocimientos previos tales como: i) términos estadísticos generales derivados de Protein Data Bank (Berman *et al.*, 2000), correlaciones $\text{C}\alpha$ /cadena lateral (Zhang *et al.*, 2007); uniones puente de hidrógeno (Zhang *et al.*, 2006) e hidrofobicidad (Chen *et al.*, 2005); ii) restricciones espaciales (Wu *et al.*, 2007); y iii) predicciones de contacto basados en secuencias (Wu *et al.*, 2008).

Finalmente, para calcular el radio de giro cuadrático medio se utilizó el programa *g_gyrate* del paquete Gromacs. El radio de giro de una proteína, calculado como la raíz cuadrada media de la distancia entre su centro de gravedad y sus extremos, es indicativo del nivel de compactación en la estructura, es decir, de cuan plegada o desplegada se encuentra la cadena polipeptídica. En la Tabla 3.2 se muestran las características de las distintas proteínas utilizadas.

Tabla 3.2. Características de las distintas proteínas recombinantes del *T. cruzi* utilizadas

Nombre	Nº de aa	PM (KDa)	pI teórico	Rg (nm) teórico	Longitud de la repetición de aa	Tipo de proteína	Uso diagnóstico	Imagen
FRA-pET32a	252	28	5,48	2,17	68	Asociada al citoesqueleto	Infección crónica	
SAPA-pET32a	257	27	5,32	2,11	12	Familia de las Trassialidasas	Infecciones agudas y congénitas	
Ag36		26	5,00	2,7	38	Asociada al microtubulo	Infección aguda y crónica	
CP1-pET32a	325	35	5,29	2,78	-	Quimérica (FRA+SAPA)	Infección aguda y crónica	
CP1-pET24a	174	19	5,36	1,70	-	Quimérica (FRA+SAPA)	Infección aguda y crónica	

3.2.10. CONCLUSIONES

En este capítulo se procedió a la obtención y caracterización de las proteínas antigénicas a utilizar posteriormente en la sensibilización de las partículas de látex.

Los antígenos FRA y CP1 se expresaron empleando la tecnología del ADN recombinante. Los resultados obtenidos durante el ensayo de ELISA para evaluar la antigenicidad mostró que ambas proteínas son antígenos de alta especificidad para anticuerpos presentes en el suero de pacientes chagásicos. De esta manera, las proteínas recombinantes sintetizadas pueden ser utilizadas en el desarrollo de látex biofuncionales con potenciales aplicaciones para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.

Tanto FRA (pET32a) como CP1 (pET24a) se obtuvieron con un alto grado de pureza y con una adecuada concentración, obteniéndose, en ambos casos, el mayor pico de elución al pasar la solución BL2 siendo posible de este modo su uso en la sensibilización de las partículas de látex y la comparación de resultados con el Homogenato del parásito.

CAPÍTULO 4: SENSIBILIZACION DE LAS PARTICULAS CON PROTEINAS ANTIGENICAS DEL *T. CRUZI*

4.1. INTRODUCCION

Una vez sintetizados y caracterizados los látex y obtenidas las proteínas recombinantes de interés, el paso siguiente es la sensibilización de las partículas con las proteínas antigénicas para su posterior aplicación en inmunoensayos.

Obtener una partícula polimérica sensibilizada es posible gracias a la acumulación de moléculas en la región interfacial entre la superficie de las partículas y las proteínas antigénicas. Estrictamente hablando, el proceso de sensibilización se basa en la adsorción física (interacciones electrostáticas, hidrofóbicas.) o unión covalente de las proteínas antigénicas sobre la superficie de las partículas, sin alterar su actividad biológica.

El proceso de adsorción física de proteínas ocurre cuando una solución de proteínas se pone en contacto con una fase sólida. La proteína se transporta desde la solución a la región sub-superficial, donde interacciona con la superficie. Una vez que se encuentra sobre la superficie, puede relajarse para optimizar la interacción proteína-superficie, aumentando el número de contactos entre ambas. Esta relajación, normalmente involucra rearrreglos estructurales o cambios conformacionales en la biomolécula, que podrían ocasionar una disminución en la actividad biológica. Además, los sitios activos de

la molécula pueden verse comprometidos en la interacción con la superficie. Esto puede dar lugar a que se vea afectado el reconocimiento antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) durante el inmunoensayo.

Además, debido a que la adsorción pasiva es parcialmente reversible, la proteína se puede desorber de la superficie, por dilución, por cambios en el pH o en la fuerza iónica (I), por desplazamiento por compuestos de bajo peso molecular (PM), o por intercambio con las moléculas de la solución (Norde *et al.*, 1999). También puede ocurrir que algunas moléculas no se desorban totalmente, pero si lo hagan algunos fragmentos de las mismas, que luego se pueden readsorber en otra conformación, alterando así el comportamiento del reactivo. A lo anterior pueden sumarse reacciones de aglutinación inespecíficas. Todos estos inconvenientes pueden eliminarse o minimizarse si la proteína se une covalentemente a grupos funcionales presentes en la superficie de las partículas.

La unión covalente de proteínas cuenta con varias ventajas respecto de la adsorción física. Es más fuerte, estable y se puede inducir una orientación preferencial de la proteína sobre la superficie. En consecuencia, se evitan los problemas de relajación, desorción, intercambio con otras moléculas y compromiso de los sitios biológicamente activos con la superficie, que presenta la adsorción física. Además, las superficies hidrofílicas presentan menos interacciones no específicas que las superficies hidrofóbicas (Elwing *et al.*, 1988).

En la actualidad, la mayoría de las investigaciones dedicadas al inmunodiagnóstico mediante pruebas de aglutinación se centran en la obtención de complejos látex-proteína mediante unión covalente. Para realizar este tipo de unión, es necesario sintetizar partículas de látex con una funcionalidad superficial tal que pueda reaccionar eficazmente con las proteínas. Aunque se pueden sintetizar microesferas de tipo muy diverso, las funcionalidades más habituales son: i) aldehído (Yan *et al.*, 1990;

Charleux *et al.*, 1992; Bastos *et al.*, 1994; Slomkowski *et al.*, 2002), ii) carboxilo (Bahadur *et al.*, 1985; Bastos-Gonzales *et al.*, 1995; Gonzalez *et al.*, 2008), iii) acetal (Kapmeyer *et al.*, 1988; Kapmeyer *et al.*, 1991; Peula *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 1996; Bucsi *et al.*, 1998; Sarobe *et al.*, 1998; Miraballes y Forcada, 2000; Gibanel *et al.*, 2001; Miraballes *et al.*, 2001; Santos y Forcada; 2001; Sanz-Izquierdo *et al.*, 2004), iv) hidroxilo (Okubo *et al.*, 1987), v) amino (Delair *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 2003; Sanz-Izquierdo *et al.*, 2004), y vi) clorometilo (Suen *et al.*, 1985; Sarobe *et al.*, 1996; Sarobe *et al.*, 1998; Sanz-Izquierdo *et al.*, 2004).

En este Capítulo, se estudia la sensibilización (o formación de los complejos látex-proteína) mediante adsorción física y unión covalente de las partículas de látex sintetizadas previamente (Capítulo 2) con las distintas proteínas antigénicas del *T. cruzi* (proteínas recombinantes simples y quiméricas, y Homogenato del parásito) obtenidas previamente (Capítulo 3). Se analizarán las condiciones más apropiadas para la unión de las proteínas antigénicas sobre los distintos soportes poliméricos; la influencia del pH del medio de reacción en la cantidad de proteína unida; y la variación de la cantidad de proteína unida con la concentración de proteína adicionada, procurando establecer las características más adecuadas para el desempeño posterior de los complejos látex-proteína en la detección de la Enfermedad de Chagas.

4.2. TRABAJO EXPERIMENTAL

4.2.1. Adsorción Física

Se realizaron experimentos de adsorción física de cuatro proteínas distintas (Homogenato de *T. cruzi*, CP1, FRA y Ag36) sobre el látex S4 de PS. Se usaron distintos buffer: glicina (pH 3), conteniendo $C_2H_5NO_2$ (Sigma) y HCl; acetato (pH 5), conteniendo $NaCH_3COO \cdot 3H_2O$ (Cicarelli, Argentina) y CH_3COOH (Anedra, Argentina); fosfato (pH 7), conteniendo NaH_2PO_4 (Cicarelli, Argentina) y Na_2HPO_4 (Cicarelli, Argentina); y carbonato

(pH 9), conteniendo Na_2CO_3 (Cicarelli, Argentina) y NaHCO_3 (Cicarelli, Argentina). La fuerza iónica final en todos los casos fue de 2 mM.

Se realizaron experimentos tipo “batch”, mezclando en tubos eppendorff de 1,5 mL las partículas de látex (superficie de 0,2 o 0,3 m^2), el buffer y las distintas proteínas en concentraciones crecientes (0,02 a 1,2 mg/mL). La Fig. 4.1 muestra una representación esquemática de los experimentos de adsorción física, y en las Tablas 4.1 a 4.4 se detallan las recetas utilizadas y las densidades superficiales resultantes para cada proteína. Se realizó también un blanco de látex (BL) para restar toda lectura de absorbancia que no corresponda a la proteína que se desea detectar. Las muestras se agitaron suavemente durante 5 h a temperatura ambiente, y luego se centrifugaron durante 30 minutos a 10.000 rpm (7200 xg) en un equipo Du Pont Instruments, Sorvall RC-5B. Las concentraciones de proteínas presentes en los sobrenadantes se determinaron mediante el método del ácido bicinconínico (BCA, Pierce). Los complejos látex-proteína se redispersaron en buffer borato de pH 8, para su almacenamiento y posterior utilización en los inmunoensayos. La disolución de almacenamiento contiene tampón borato 2 mM, pH 8 (Anedra), y 0,1 mg/mL de azida sódica (N_3Na)

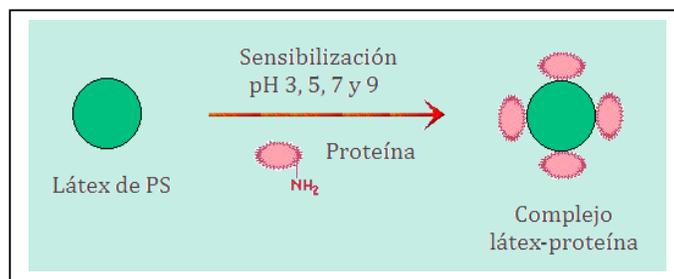


Figura 4.1. Representación esquemática del proceso de sensibilización mediante adsorción física.

La cantidad de proteína adsorbida se determinó mediante un balance de masa, por diferencia entre la cantidad de proteína adicionada y la determinada en el sobrenadante. Luego, se calculó la proteína adsorbida por unidad de área superficial (o

densidad superficial) considerando a las partículas como monodispersas y a partir del diámetro medio obtenido por DLS a 90°.

En general, la máxima adsorción se produce a pH 5, es decir, cerca del pI de las proteínas, donde se minimizan las repulsiones electrostáticas intra e intermoleculares (Vermeer *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2008). Las diferencias en la proteína adsorbida cuando el pH se aparta del pI, se debe a que al aumentar la carga neta de la proteína, ésta tiende a sufrir variaciones estructurales que aumentan el área superficial por molécula, y disminuyen la cantidad adsorbida. Otra posible razón de la disminución en la cantidad de proteína adsorbida es el aumento de la repulsión electrostática lateral entre moléculas adsorbidas (Bagchi y Birnbaum, 1981).

La Fig. 4.2 muestra las isotermas de adsorción del Homogenato del *T. cruzi* sobre las partículas de PS (S4) a los cuatro pH considerados. Se representa la cantidad adsorbida de proteína por unidad de área de partículas (Γ , mg/m²) frente a la concentración de proteína en solución en el equilibrio ($C_{\text{Hom, sol}}$, mg/mL), es decir, aquella que no se ha adsorbido. La pendiente inicial de las isotermas de adsorción provee información sobre la afinidad entre la proteína y la superficie de la partícula de látex. Cuanto más tienda ésta a la adsorción total (pendiente ∞), mayor será la afinidad entre ambas.

La máxima adsorción (3,77 mg de Homogenato/m²) fue observada en el experimento B a pH 5, es decir cerca del pI de la mezcla de proteínas. Sin embargo, la mayor pendiente de las isotermas de adsorción se observó a pH 9 (experimento D). Esto puede deberse a que, como el Homogenato del *T. cruzi* es una mezcla de proteínas, la fracción adsorbida a pH 9 (con carga neta cero a ese pH), exhiba mayor afinidad por la superficie de la partícula que la fracción remanente adsorbida a otros pH.

Tabla 4.1. Adsorción física del Homogenato del *T. cruzi* sobre partículas de PS.

Recetas y densidades superficiales (Γ_{Hom}).

	Muestra						
	1	2	3	4	5	6	7
Receta común							
Látex PS ^(a) (mL)	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
Buffer ^(b) (mL)	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030
H ₂ O (mL)	0,870	0,829	0,747	0,665	0,583	0,500	0,377
Solución del Homogenato ^(c) (ml)	-	0,041	0,123	0,205	0,287	0,370	0,493
C_{Hom}° ^(d) (mg/mL)	-	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9	1,2
Experimento							
A (pH 3) Γ_{Hom} (mg/m ²)	-	0,44	1,31	2,15	2,88	3,26	3,26
B (pH 5) Γ_{Hom} (mg/m ²)	-	0,49	1,50	2,42	3,17	3,76	3,77
C (pH 7) Γ_{Hom} (mg/m ²)	-	0,49	1,36	2,20	2,94	3,26	3,29
D (pH 9) Γ_{Hom} (mg/m ²)	-	0,53	1,60	2,63	3,35	-	3,35

(a) Área Superficial = 0,2 m².

(b) Concentración = 0,1 M del buffer apropiado.

(c) Concentración = 3,42 mg/mL.

(d) Concentración inicial de proteína.

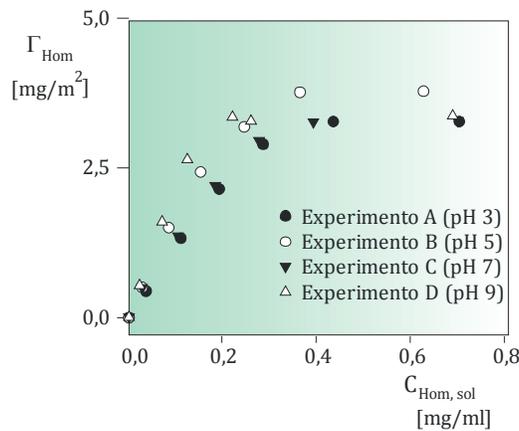


Figura 4.2. Experimentos A-D de adsorción física del Homogenato del *T. cruzi* sobre partículas de PS. La masa de proteína adsorbida por unidad de área superficial, Γ_{Hom} , se representa en función de la concentración de proteína no adsorbida en solución en el equilibrio, $C_{\text{Hom, sol}}$.

En los experimentos E y F con el Ag recombinante Ag36 (Tabla 4.2), la máxima adsorción fue de 4,31 mg/m² a pH 5, nuevamente cerca del pI de la proteína. Desafortunadamente, debido a que se contó con muy poca cantidad de Ag36, se analizaron solamente cuatro condiciones (2 concentraciones y 2 pH) con esta proteína.

Tabla 4.2. Adsorción física de la proteína recombinante Ag36 sobre partículas de PS.
Recetas y densidades superficiales (Γ_{Ag36}).

		Muestra		
		1	2	3
Receta común				
	Látex PS ^(a) (mL)	0,300	0,300	0,300
	Buffer ^(b) (mL)	0,030	0,030	0,030
	H ₂ O (mL)	1,070	1,015	0,885
	Solución de Ag36 ^(c) (mL)	-	0,055	0,185
	C _{Ag36} ^o ^(d) (mg/mL)	-	0,3	1,0
Experimento				
E (pH 5)	C _{Ag36, sol} (mg/mL) ^(e)	-	0,038	0,076
	Γ_{Ag36} (mg/m ²)	-	1,22	4,310
F (pH 7)	C _{Ag36, sol} (mg/mL) ^(e)	-	0,083	0,178
	Γ_{Ag36} (mg/m ²)	-	1,010	3,840

(a) Área Superficial = 0,3 m².

(b) Concentración = 0,1 M del buffer apropiado.

(c) Concentración = 7,56 mg/mL.

(d) Concentración inicial de proteína.

(e) Concentración de proteína en solución en el equilibrio.

En la Tabla 4.3 se muestran los resultados de adsorción física de la proteína FRA sobre partículas de PS para una única concentración inicial de proteína (0,9 mg/mL) a distintos pH. Debido a que la cantidad de proteína adsorbida resultó similar en todos los casos, cabe suponer que toda la proteína fue adsorbida, y que la concentración inicial empleada no fue suficiente para reflejar el efecto del pH sobre el proceso de adsorción. Para esta proteína, al igual que con las demás proteínas recombinantes empleadas, se esperaría que la máxima cantidad de proteína adsorbida se obtenga a pH 5, es decir, cerca del pI de la misma, donde las repulsiones electrostáticas se minimizan debido a la ausencia de carga.

Para la proteína quimérica recombinante CP1 expresada en pET24a, los resultados se muestran en la Tabla 4.4 y en la Fig. 4.3. En los experimentos realizados con CP1, se observa que la cantidad adsorbida fue relativamente alta a pH 5 y 7 (Experimentos L y M). Sin embargo, la máxima adsorción (3,83 mg /m²) ocurrió a pH 5, es decir cerca de su pI (5,4).

Tabla 4.3. Adsorción física de la proteína recombinante simple FRA sobre partículas de PS. Recetas y densidades superficiales (Γ_{FRA}).

		Muestra	
		1	2
Receta común			
	Látex PS ^(a) (mL)	0,300	0,300
	Buffer ^(b) (mL)	0,030	0,030
	H2O (mL)	1,070	0,794
	Solución de FRA ^(c) (mL)	-	0,267
	C ^o _{FRA} ^(d) (mg/mL)	-	0,9
Experimento			
G (pH 3)	Γ_{FRA} (mg/m ²)	-	5,27
H (pH 5)	Γ_{FRA} (mg/m ²)	-	5,40
I (pH 7)	Γ_{FRA} (mg/m ²)	-	5,16
J (pH 9)	Γ_{FRA} (mg/m ²)	-	5,45

^(a) Área Superficial = 0,2 m².

^(b) Concentración = 0,1 M del buffer apropiado.

^(c) Concentración = 2,55 mg/mL.

^(d) Concentración inicial de proteína.

Tabla 4.4. Adsorción física de la proteína CP1 expresada en pET24a sobre partículas de PS. Recetas y densidades superficiales (Γ_{CP1}).

		Muestra						
		1	2	3	4	5	6	7
Receta común								
	Látex PS ^(a) (mL)	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
	Buffer ^(b) (mL)	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030
	H2O (mL)	0,870	0,858	0,847	0,823	0,777	0,683	0,838
	Solución de CP1 ^(c) (mL)	-	0,261	0,474	0,932	0,187	0,232	0,257
	C ^o _{CP1} ^(d) (mg/mL)	-	0,1	0,2	0,4	0,8	0,9	1,1
Experimento								
K (pH 3)	Γ_{CP1} (mg/m ²)	-	0,27	0,63	1,22	1,74	1,86	-
L (pH 5)	Γ_{CP1} (mg/m ²)	-	-	1,29	1,84	3,29	3,35	3,83
M (pH 7)	Γ_{CP1} (mg/m ²)	-	-	1,13	1,76	2,99	3,09	3,32
N (pH 9)	Γ_{CP1} (mg/m ²)	-	0,35	0,70	1,41	2,17	2,32	-

^(a) Área Superficial = 0,2 m².

^(b) Concentración = 0,1 M del buffer apropiado.

^(c) Concentración = 6,00 mg/mL.

^(d) Concentración inicial de proteína.

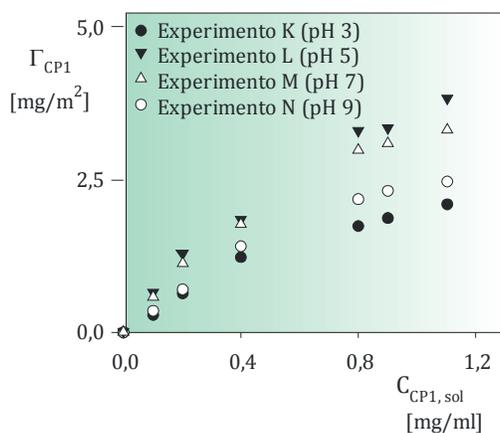


Figura 4.3. Experimentos K-N de adsorción física de la proteína CP1 sobre partículas de PS. La masa de proteína adsorbida por unidad de área superficial, Γ_{CP1} , se representa en función de la concentración de proteína no adsorbida en solución en el equilibrio, $C_{CP1, sol}$.

A pH 3 (Exp. K), la proteína presenta predominantemente carga positiva, lo que incrementa las repulsiones intermoleculares. Además el aminoácido presente en el buffer de reacción (Glicina) puede interferir en el proceso de adsorción, compitiendo con la CP1, lo que podría estar justificando la menor cantidad de proteína adsorbida.

A pH 9 (Exp. N), la proteína está cargada negativamente, incrementando las repulsiones electrostáticas entre las moléculas de proteína, y entre la proteína y la superficie de las partículas (que presentan carga negativa debida a los grupos SO_4^{2-} provenientes del iniciador). Como consecuencia, la cantidad de proteína adsorbida es menor que en las condiciones del pI.

Al comparar la influencia del pH sobre la adsorción de la proteína recombinante simple FRA y la quimérica CP1 se observó que para el caso de la FRA, la influencia del pH fue menor. Analizando la secuencia de aminoácidos que componen las distintas proteínas, se observó que la proteína FRA es más neutra. En consecuencia, a pH elevado (mayor al pI de la proteína), la proteína CP1 tendría mayor carga negativa en comparación con la FRA lo que provocaría una mayor repulsión con la superficie de la partícula y en consecuencia, una menor cantidad de proteína adsorbida.

4.2.2. Unión Covalente sobre Partículas con Funcionalidad Carboxilo

Se realizaron experimentos tipo “batch” a temperatura ambiente y a dos pH diferentes (5 y 7), mezclando en tubos eppendorff de 1,5 mL las partículas de látex con funcionalidad carboxilo (R2, 0,1-0,18 m² de superficie), el activador de los grupos carboxilo (EDC), el buffer fosfato (fuerza iónica final 2 mM) y cantidades crecientes de proteína (0,3-1,2 mg/mL). Para cada experiencia, se preparó un blanco sin proteína. La solución de EDC se preparó justo antes de su uso. Para ello se pesaron 15 mg de EDC y se adicionó 1 mL de agua deionizada. La cantidad de EDC agregada fue 100 veces mayor que la concentración de grupos carboxilo, a fin de asegurar una transformación completa de los grupos carboxilo en acilurea. Dicha cantidad se calculó para obtener una concentración de 10 mg de EDC /m² de látex en cada tubo.

Las muestras se agitaron suavemente durante 5 h. Los complejos látex-proteína se separaron de la solución centrifugando 30 minutos a 10000 rpm (o 7200 xg) y la proteína presente en el sobrenadante se cuantificó por el método del ácido bicinónico (BCA). La cantidad total de proteína unida a la superficie de las partículas, que incluye tanto a la adsorbida físicamente como a la unida covalentemente, se determinó mediante un balance de masa (Turková *et al.*, 1999).

Para evitar los problemas asociados a la presencia de proteínas adsorbidas físicamente durante el inmunoensayo, los látex sensibilizados se trataron con un emulsificante que permita eliminar la proteína adsorbida, de manera de asegurar que toda la proteína presente en la superficie de las partículas de polímero esté unida covalentemente (Kapmeyer *et al.*, 1988; Peula *et al.*, 1995). Para ello, los complejos látex-proteína separados por centrifugación se redispersaron en Tritón X-100 al 1% y se mantuvieron bajo agitación durante 24 h. Luego de centrifugar, se determinó la cantidad de proteína presente en el sobrenadante por el método del BCA, y los complejos

látex-proteína se redispersaron, con la ayuda de ultrasonido, en buffer borato pH 8 para su almacenamiento y posterior utilización en los inmunoensayos.

Si se supone que la proteína adsorbida es completamente desplazada por el emulsificante, la cantidad de proteína unida covalentemente se puede calcular por diferencia entre la proteína total unida y la que permanece en el sobrenadante luego del proceso de desorción. La Fig. 4.4 muestra un esquema del proceso de sensibilización por unión covalente de partículas de látex carboxilado.

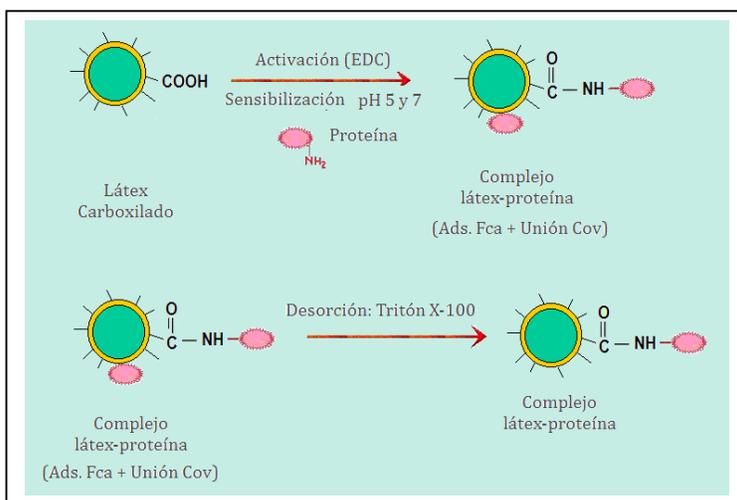


Figura 4.4. Esquema del proceso involucrado en la unión covalente de la proteína con los grupos funcionales superficiales de las partículas carboxiladas.

Los resultados de la unión covalente del Homogenato del *T. cruzi*, y de las proteínas recombinantes Ag36, FRA y CP1 sobre el látex carboxilado R2 a pH 5 y pH 7, se muestran en las Tablas 4.5 a 4.9 y en las Figs. 4.5 a 4.9. En las figuras se representa la cantidad de proteína unida sobre las partículas carboxiladas (Γ_{Prot} , mg/m^2) en función de la concentración inicial de proteína (C_{Prot}° , mg/mL). Las densidades de proteína total unida a la superficie de las partículas (barras verde oscuro) se compara con las densidades de proteína ligada en forma covalente (barras verde claro) determinada después del proceso de desorción con Tritón X-100 al 1%.

Tabla 4.5. Unión covalente del Homogenato del *T. cruzi* sobre partículas carboxiladas. Recetas, densidades superficiales (Γ_{Hom}) y fracciones unidas covalentemente.

		Muestra			
		1	2	3	4
Receta común ^(a)					
	Látex R2 ^(b) (mL)	0,790	0,790	0,790	0,790
	Solución de EDC ^(c) (mL)	0,067	0,067	0,067	0,067
	Buffer ^(d) (mL)	0,030	0,030	0,030	0,030
	H ₂ O (mL)	0,513	0,390	0,267	0,143
	Solución del Homogenato ^(e) (mL)	-	0,123	0,246	0,370
	C_{Hom}° (mg/mL)	-	0,3	0,6	0,9
Experimento					
1 (pH 5)	Γ_{Hom} (mg/m ²)	-	0,88	0,85	0,82
	% Hom Unido Covalentemente		47	40	35
	% Hom Unido Cov./ Adicionada		21	10	7
2 (pH 7)	Γ_{Hom} (mg/m ²)	-	0,87	0,83	0,81
	% Hom Unido Covalentemente		49	39	33
	% Hom Unido Cov./ Adicionada		21	10	6

(a) Para el proceso de desorción se usaron 1,4 mL de Tritón X-100 1%.

(b) Área superficial = 0,1 m².

(c) Concentración = 15 mg/mL.

(d) Concentración = 0,1 M de buffer fosfato.

(e) Concentración = 3,41 mg/mL.

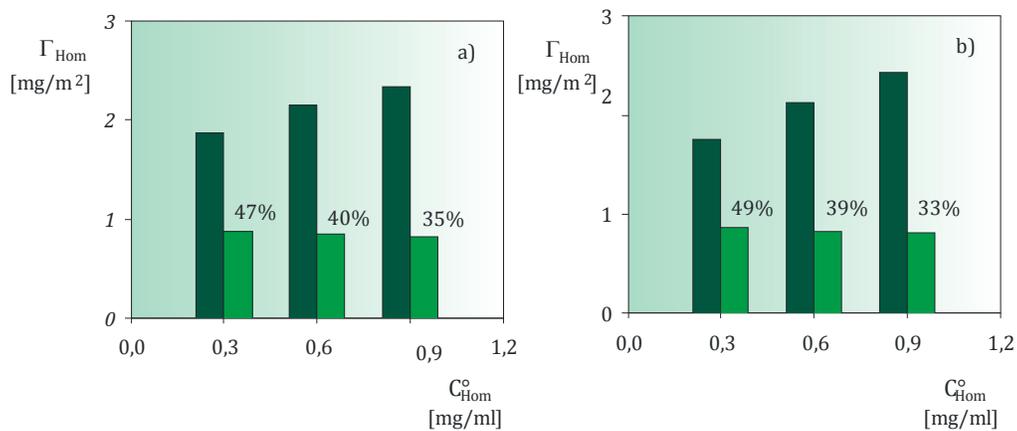


Figura 4.5. Unión covalente del Homogenato del *T. cruzi* sobre las partículas carboxiladas. a) pH 5; b) pH 7. Proteína unida total (barra verde oscuro) y proteína unida covalentemente (barra verde claro) en función de la concentración de proteína inicial, C_{Hom}° . El porcentaje sobre la barra verde claro indica la fracción de proteína unida covalentemente.

Tabla 4.6. Unión covalente de Ag36 sobre partículas carboxiladas. Recetas, densidades superficiales (Γ_{Ag36}) y fracciones unidas covalentemente.

		Muestra			
		1	2	3	4
Receta común ^(a)					
	Látex R2 ^(b) (mL)	1,000	1,000	1,000	1,000
	Solución de EDC ^(c) (mL)	0,083	0,083	0,083	0,083
	Buffer ^(d) (mL)	0,030	0,030	0,030	0,030
	H ₂ O (mL)	0,287	0,213	0,139	0,065
	Solución de Ag36 ^(e) (mL)	-	0,074	0,148	0,222
	C _{Ag36} ^o (mg/mL)	-	0,4	0,8	1,2
Experimento					
3 (pH 5)	Γ_{Ag36} (mg/m ²)	-	1,38	2,44	3,98
	% Ag36 Unida Covalentemente		83	86	90
	% Ag36 Unida Cov./ Adicionada		31	27	29
4 (pH 7)	Γ_{Ag36} (mg/m ²)	-	0,69	1,67	2,50
	% Ag36 Unida Covalentemente		72	82	82
	% Ag36 Unida Cov./ Adicionada		15	18	18

(a) Para el proceso de desorción se usaron 1,4 mL de Tritón X-100 1%.

(b) Área superficial = 0,12 m².

(c) Concentración = 15 mg/mL.

(d) Concentración = 0,1 M de buffer fosfato.

(e) Concentración = 7,56 mg/mL.

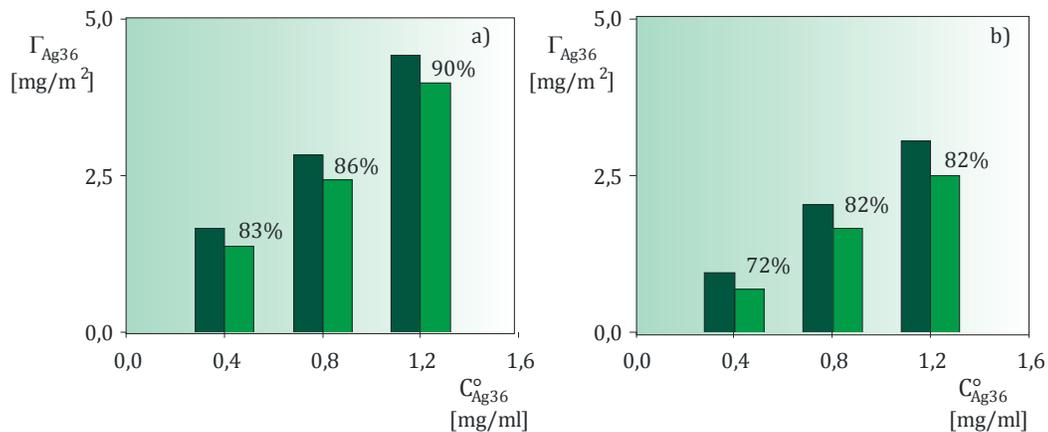


Figura 4.6. Unión covalente de Ag36 sobre las partículas carboxiladas. a) pH 5; b) pH 7. Proteína unida total (barra verde oscuro) y proteína unida covalentemente (barra verde claro) en función de la concentración de proteína inicial, C_{Ag36}^o mg/mL. El porcentaje sobre la barra verde claro indica la fracción de proteína unida covalentemente.

Tabla 4.7. Unión covalente de FRA sobre partículas carboxiladas. Recetas, densidades superficiales (Γ_{FRA}) y fracciones unidas covalentemente.

		Muestra			
		1	2	3	4
Receta común ^(a)					
Látex R2 ^(b) (mL)		0,580	0,580	0,580	0,580
Solución de EDC ^(c) (mL)		0,110	0,110	0,110	0,110
Buffer ^(d) (mL)		0,030	0,030	0,030	0,030
H ₂ O (mL)		0,680	0,512	0,344	0,178
Solución de FRA ^(e) (mL)		-	0,168	0,336	0,504
C _{FRA} ^o (mg/mL)		-	0,3	0,6	0,9
Experimento					
5 (pH 5)	Γ_{FRA} (mg/m ²)	-	2,10	2,95	3,77
	% FRA Unida Covalentemente		99	99	90
	% FRA Unida Cov/ Adicionada		89	62	53
6 (pH 7)	Γ_{FRA} (mg/m ²)	-	1,70	2,52	3,27
	% FRA Unida Covalentemente		96	90	87
	% FRA Unida Cov/ Adicionada		68	50	22

(a) Para el proceso de desorción se usaron 1,4 mL de Tritón X-100 1%.

(b) Área superficial = 0,177 m².

(c) Concentración = 15 mg/mL.

(d) Concentración = Conteniendo una solución 0,1 M de buffer fosfato.

(e) Concentración = 2,50 mg/mL.

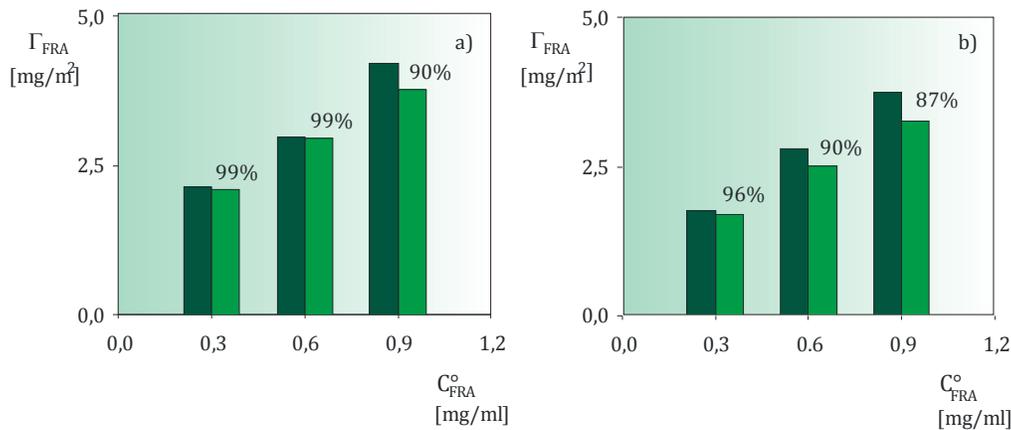


Figura 4.7. Unión covalente de FRA sobre las partículas carboxiladas. a) pH 5; b) pH 7. Proteína unida total (barra verde oscuro) y proteína unida covalentemente (barra verde claro) en función de la concentración de proteína inicial, C_{FRA}^o . El porcentaje sobre la barra verde claro indica la fracción de proteína unida covalentemente.

Tabla 4.8. Unión covalente de CP1 expresada en pET32a sobre partículas carboxiladas. Recetas, densidades superficiales (Γ_{CP1}) y fracciones unidas covalentemente.

		Muestra				
		1	2	3	4	5
Receta común ^(a)						
	Látex R2 ^(b) (mL)	0,580	0,580	0,580	0,580	0,580
	Solución de EDC ^(c) (mL)	0,110	0,110	0,110	0,110	0,110
	Buffer ^(d) (mL)	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030
	H ₂ O (mL)	0,680	0,610	0,540	0,470	0,400
	Solución de CP1 ^(e) (mL)	-	0,070	0,140	0,210	0,280
	C ^o _{CP1} (mg/mL)	-	0,3	0,6	0,9	1,2
Experimento						
7 (pH 5)	Γ_{CP1} (mg/m ²)	-	1,65	2,46	2,64	3,29
	% CP1 Unida Covalentemente	-	98	97	86	85
	% CP1 Unida Cov/ Adicionada	-	70	52	37	35

(a) Para el proceso de desorción se usaron 1,4 mL de Tritón X-100 1%.

(b) Área superficial = 0,1774 m².

(c) Concentración = 15 mg/mL.

(d) Concentración = 0,1 M de buffer fosfato.

(e) Concentración = 6,00 mg/mL.

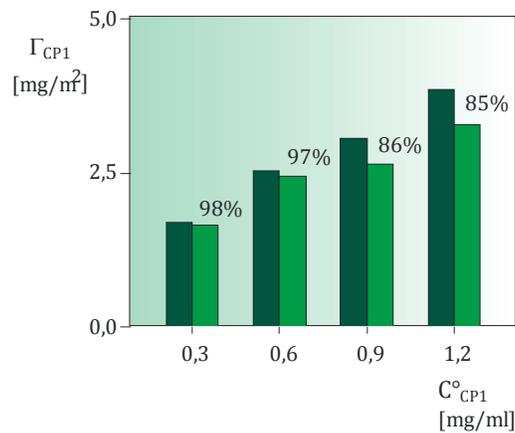


Figura 4.8. Unión covalente de CP1 expresada en pET32a sobre las partículas carboxiladas a pH 5. Proteína unida total (barra verde oscuro) y proteína unida covalentemente (barra verde claro) en función de la concentración de proteína inicial, C^o_{CP1}. El porcentaje sobre la barra verde claro indica la fracción de proteína unida covalentemente.

Tabla 4.9. Unión covalente de CP1 expresada en pET24a sobre partículas carboxiladas. Recetas, densidades superficiales (Γ_{CP1}) y fracciones unidas covalentemente.

		Muestra				
		1	2	3	4	5
Receta común ^(a)						
	Látex R2 ^(b) (mL)	0,580	0,580	0,580	0,580	0,580
	Solución de EDC ^(c) (mL)	0,110	0,110	0,110	0,110	0,110
	Buffer ^(d) (mL)	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030
	H ₂ O (mL)	0,680	0,610	0,540	0,470	0,400
	Solución de CP1 ^(e) (mL)	-	0,007	0,140	0,210	0,280
	C _{CP1} ^o (mg/mL)	-	0,3	0,6	0,9	1,2
Experimento						
8 (pH 5)	Γ_{CP1} (mg/m ²)	-	1,57	2,89	3,90	4,93
	% CP1 Unida Covalentemente		93	94	96	98
	% CP1 Unida Cov./ Adicionada		67	61	55	52
9 (pH 7)	Γ_{CP1} (mg/m ²)	-	1,35	2,57	3,27	3,98
	% CP1 Unida Covalentemente		91	88	89	87
	% CP1 Unida Cov/ Adicionada		57	54	46	42

(a) Para el proceso de desorción se usaron 1,4 mL de Tritón X-100 1%.

(b) Área superficial = 0,18 m².

(c) Concentración = 15 mg/mL.

(d) Concentración = 0,1 M de buffer fosfato.

(e) Concentración = 6,00 mg/mL.

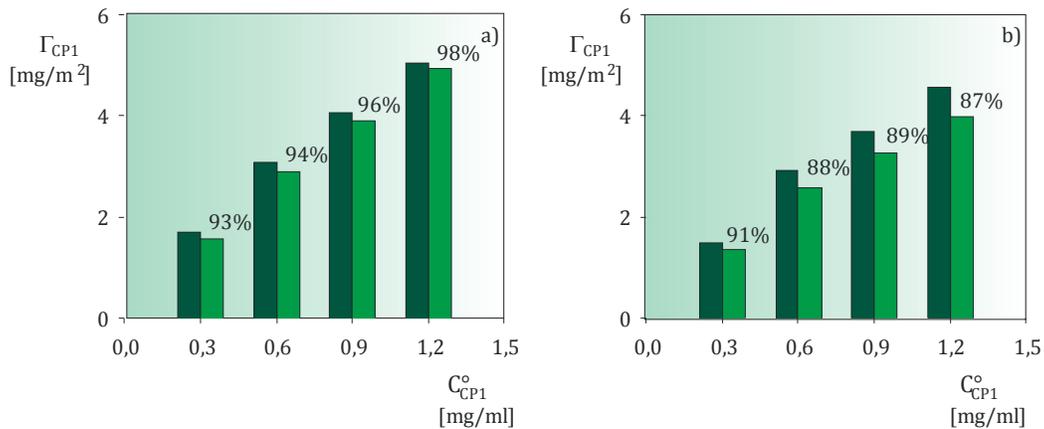


Figura 4.9. Unión covalente de CP1 sobre las partículas carboxiladas. a) pH 5; b) pH 7. Proteína unida total (barra verde oscuro) y proteína unida covalentemente (barra verde claro) en función de la concentración de proteína inicial, C_{CP1}^o . El porcentaje sobre la barra verde claro indica la fracción de proteína unida covalentemente.

Para el Homogenato de *T. cruzi*, la Tabla 4.5 y la Fig. 4.5 muestran que la fracción de proteína químicamente unida es relativamente baja (menor al 50%) y cae ligeramente con el incremento de la C_{Hom}° . Esto puede deberse a un impedimento estérico de las proteínas de mayor tamaño que pueden ocluir grupos reactivos de la superficie de la partícula y/o a las distintas reactividades de las proteínas en función de su estructura en solución. Además, no se observó dependencia de la proteína unida covalentemente con el pH, lo que puede deberse a que se trata de una mezcla indefinida de proteínas cuyos pI varían de 5,9 a 6,3.

Para la proteína recombinante simple Ag36, la Tabla 4.6 y la Fig. 4.6, muestran que la cantidad de proteína total unida y la cantidad de proteína unida covalentemente aumentan con la C_{Ag36}° . La mayor densidad de proteína unida covalentemente fue 3,98 mg/m² a pH 5, cerca del pI, y representa el 90% de la proteína unida total. Este valor es similar al obtenido en la adsorción física de Ag36 sobre partículas de PS (4,31 mg/mL, Tabla 4.2).

Para la proteína recombinante simple FRA, la Tabla 4.7 y la Fig. 4.7, muestran la dependencia de la cantidad de proteína unida con la C_{FRA}° y con el pH del medio. Nuevamente, la cantidad de FRA unida es mayor a pH 5, cerca de su pI, y disminuye a pH 7 donde la proteína presenta carga negativa. Además, se observa que la fracción de proteína unida covalentemente es muy alta, aún cuando la concentración inicial de proteína es baja, lo que puede deberse al pequeño tamaño de la misma.

Para la proteína recombinante quimérica CP1 expresada tanto en el vector pET32a (Tabla 4.8 y Fig. 4.8), como en el vector pET24a (Tabla 4.9 y Fig. 4.9), la cantidad de proteína total unida y la cantidad de proteína unida covalentemente aumentan con la concentración inicial de proteína (C_{CP1}°). La mayor densidad de proteína unida

covalentemente fue 3,29 mg/m² y 4,93 mg/m² a pH 5, representando el 85% y el 98% de la proteína unida total, respectivamente. El valor obtenido para la proteína CP1 en pET24a, resultó aún mayor que el obtenido en la sensibilización por adsorción física sobre partículas de PS (3,83 mg/m², Tabla 4.4). Esto puede deberse al el pequeño tamaño de la proteína (19 kDa) y a la disminución del proceso de relajación de la misma. Durante la adsorción física, una vez que ocurre la interacción superficie-antígeno, la proteína puede relajarse para optimizar la interacción aumentando el número de contactos entre ambas partes y disminuyendo la superficie libre disponible para la adsorción de otras proteínas. Durante la unión covalente, en cambio, se puede inducir una orientación de la proteína sobre la superficie, evitando los problemas de relajación. Dicha orientación conlleva además una serie de ventajas, como buena accesibilidad de los sitios activos, alta estabilidad estructural y óptima respuesta biológica de la proteína (Turková, 1999).

En general, si las condiciones del medio no son las adecuadas para que las proteínas se aproximen a la superficie de las partículas, entonces no habrá unión covalente o la misma ocurrirá en menor medida. Cuando el pH del medio es mayor al pI de la proteína (pH 7 en nuestro caso), los grupos ionizables se encuentran desprotonados y la carga neta de la proteína es negativa generando repulsión electrostática entre la proteína y la superficie. Debido a esto, a la proteína le resulta más difícil atravesar la doble capa eléctrica y por lo tanto es menos factible que se produzca la unión covalente de la misma (Koning *et al.*, 1993). Además, hay repulsiones entre moléculas de proteínas vecinas, lo que hace disminuir la cantidad de proteína unida. En cambio, la unión covalente se vería favorecida a pH 5, cercano pI de la proteína, donde la carga neta de la proteína es cero y, por lo tanto, no hay repulsión entre la proteína y la superficie de la partícula, ni hay repulsión entre moléculas vecinas. Para la proteína recombinante simple Ag36, se observa un efecto más notorio de la influencia del pH sobre la unión de la proteína a la superficie en comparación con las demás proteínas recombinantes (FRA y CP1) y con el Homogenato

del *T. cruzi*. Para poder explicar este comportamiento debería hacerse un análisis no sólo de la secuencia de aminoácidos que la componen, sino también de la estructura que adopta en solución.

En el caso de las proteínas recombinantes, en el rango de concentraciones investigado, se observa que al aumentar la concentración de proteína adicionada aumenta tanto la proteína total unida como la proteína unida covalentemente. Sin embargo, la relación entre la proteína unida covalentemente y la proteína adicionada en general disminuye al aumentar la concentración de proteína adicionada debido a la saturación de los grupos carboxilos superficiales (Fig. 4.10).

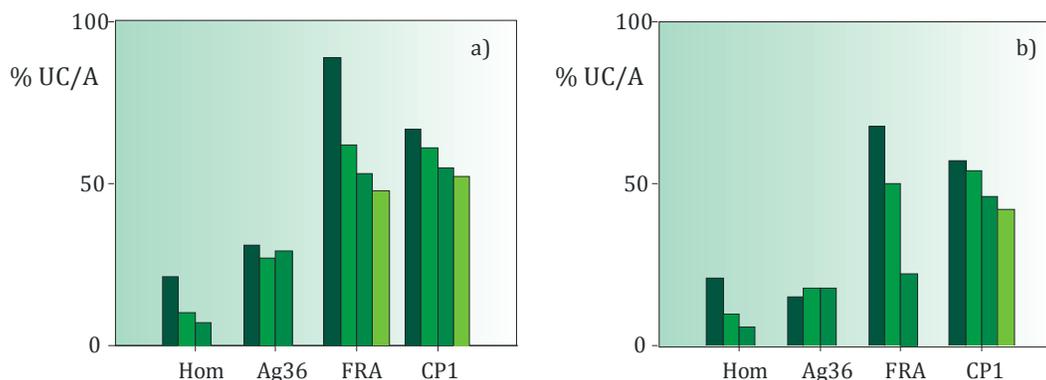


Figura 4.10. Relación entre la proteína unida covalentemente (UC) y la proteína adicionada (A) para las distintas proteínas recombinantes a pH 5 (a) y pH 7 (b). $C_{Prot}^{\circ} = 0,3$ (■); $C_{Prot}^{\circ} = 0,6$ (■); $C_{Prot}^{\circ} = 0,9$ (■); $C_{Prot}^{\circ} = 1,2$ (■) mg/mL.

En la Tabla 4.10 se muestra la relación entre la cantidad de grupos carboxilo superficiales y la cantidad de proteína unida covalentemente. Se observa que a medida que la C° aumenta, la relación disminuye, lo que estaría indicando una saturación de los grupos superficiales con la proteína. Además, puede verse que la proteína CP1 expresada en pET24a (19 kDa), para una misma C° , presenta siempre una relación menor a la de FRA (28 kDa) y CP1 expresada en pET32a (35 kDa). Esto puede deberse a que la proteína recombinante quimérica CP1 expresada en pET24a, al tener un tamaño menor, podría

acomodarse mejor sobre la superficie de la partícula lo que provocaría una menor oclusión de los grupos funcionales superficiales.

Tabla 4.10. Relación entre la cantidad de grupos carboxilo superficiales y la cantidad de proteína unida a medida que aumenta la C_{Prot}^o (mg/mL).

Complejo/ C_{Prot}^o	pH = 5				pH = 7			
	0,3	0,6	0,9	1,2	0,3	0,6	0,9	1,2
R2-CP1 pET32a	169,11	113,30	105,36	84,64	-	-	-	-
R2-FRA pET32a	105,96	75,34	59,10	49,19	131,27	88,47	68,07	-
R2-CP1 pET24a	95,87	52,14	38,74	30,66	111,57	58,69	46,21	37,91

Finalmente, para el caso de las proteínas recombinantes (Ag36, FRA, CP1) las altas fracciones de proteínas unidas covalentemente a pH 5 podría hacer innecesaria la desorción de las proteínas adsorbidas físicamente, reduciendo así, el riesgo de desnaturalización.

4.2.3. Unión Covalente sobre Partículas con Funcionalidad Acetal

Los grupos aldehído superficiales de los coloides poliméricos reaccionan directamente con los grupos amino de las proteínas, formando iminas. Las iminas, o bases de Schiff, se caracterizan por poseer un doble enlace inestable que se hidroliza fácilmente llegando incluso a producir la separación entre la proteína y la superficie del látex. Para evitar esto, una vez obtenidos los dobles enlaces se reducen a enlaces simples con un agente reductor.

En la preparación de los complejos látex-proteína, para cada uno de estos látex, se varió la concentración de proteína adicionada. El resto de condiciones y variables experimentales (cantidad de látex, pH de sensibilización, tiempo de activación, sensibilización y reducción) se mantuvieron constantes.

El procedimiento de sensibilización que se siguió para la preparación de los complejos látex-proteína unidos covalentemente se basó en el empleado por J. M. Peula (1995) en su Tesis Doctoral.

En primer lugar, se adicionó a los tubos eppendorff, el látex, el agua y las cantidades correspondientes de proteína de concentración conocida. También se preparó un BL en ausencia de proteína. Luego se realizó la activación de los grupos acetal, transformándolos en grupos aldehído. Este proceso de activación se realizó durante 30 minutos y se llevó a cabo mediante la acidificación del medio a pH 2 con la adición de HCl (Merck), siguiendo el procedimiento indicado en Kapmeyer *et al.* (1988).

Posteriormente, se llevó a cabo la etapa de acoplamiento de la proteína, ajustando el pH a 5 mediante la adición de un tampón acetato. Los experimentos de sensibilización sólo se realizaron a este pH, donde se favorece el acercamiento de las proteínas a la superficie de las partículas de látex. El acoplamiento se llevó a cabo durante 2 horas, a temperatura ambiente y con agitación suave. El procedimiento de activación/sensibilización de los látex acetal se esquematiza en la Fig. 4.11.

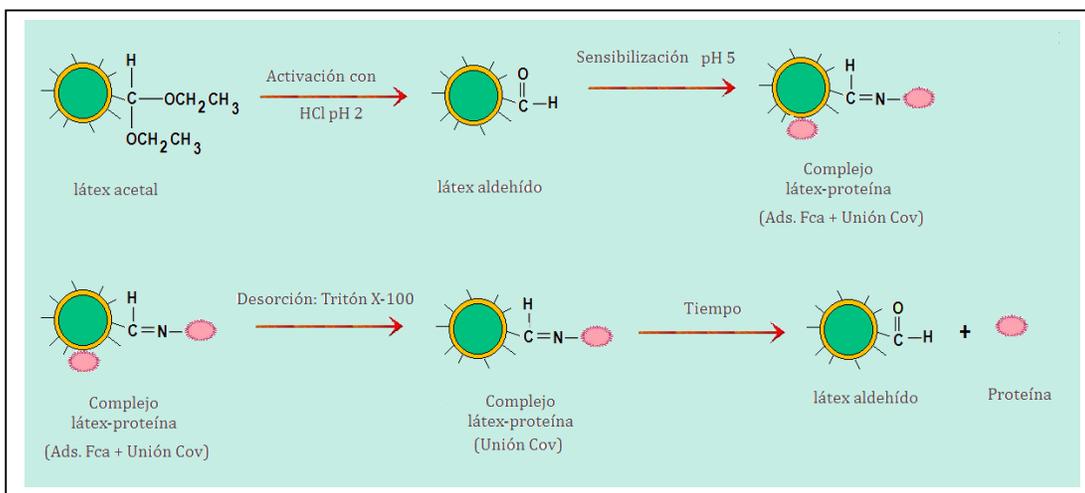


Figura 4.11. Esquema del proceso involucrado en la unión covalente de las proteínas antigénicas con los grupos funcionales superficiales de partículas de látex acetal.

Los látex sensibilizados se centrifugaron a 10.000 rpm durante 30 minutos a 10°C para separar los complejos látex-proteína del sobrenadante. La proteína residual se cuantificó mediante el método del BCA. Aplicando un balance de materia se determinó la cantidad de proteína unida inicialmente a la superficie de las partículas poliméricas, tanto física como covalentemente. La cantidad de proteína unida total es igual a la cantidad de proteína adicionada menos la cantidad de proteína no unida y determinada en el sobrenadante.

Con el objeto de eliminar las proteínas adsorbidas físicamente a la superficie de las partículas, los complejos látex-proteína se redispersaron en Tritón X-100 al 1%. Transcurridas 24 horas, los látex se centrifugaron a 10.000 rpm por 30 minutos a 10°C. La cantidad de proteína presente en el sobrenadante se cuantificó por el método del BCA. La proteína covalentemente unida se calculó por diferencia entre la cantidad de proteína inicialmente unida y la cantidad de proteína desorbida.

Por último, los complejos se redispersaron, con ayuda de ultrasonido, en buffer borato pH 8 para su almacenamiento y posterior utilización en los inmunoensayos.

Los ensayos de unión covalente sobre látex con funcionalidad acetal (A1 y A2) se llevaron a cabo con las proteínas recombinantes FRA y CP1 expresada en pET24a. Los resultados se muestran en las Tablas 4.11 a 4.14 y en las Fig. 4.12 y 4.13; donde las densidades de proteína unida total a la superficie de los látex se comparan con la densidad de proteína ligada covalentemente después del proceso de desorción con Tritón X-100. En todos los casos se observa que, al aumentar la concentración de proteína adicionada, se incrementa la cantidad de proteína total unida y la cantidad de proteína ligada covalentemente.

Tabla 4.11. Unión covalente de FRA sobre las partículas con funcionalidad acetal A1. Recetas, densidades superficiales (Γ_{FRA}) y fracciones unidas covalentemente.

		Muestra				
		1	2	3	4	5
Receta común ^(a)						
Látex A1 ^(b) (mL)		0,654	0,654	0,654	0,654	0,654
H ₂ O (mL)		0,746	0,629	0,511	0,394	0,277
Solución de FRA ^(c) (mL)		-	0,117	0,235	0,352	0,469
C _{FRA} ^o (mg/mL)		-	0,3	0,6	0,9	1,2
Experimento						
10 (pH 5)	Γ_{FRA} (mg/m ²)	-	1,09	1,67	2,87	4,70
	% FRA Unida Covalentemente	-	62	80	84	87
	% FRA Unida Cov/ Adicionada	-	52	40	45	56

^(a) Para el proceso de activación de los grupos acetal se usó 20 μ l de HCl 0,5 M. El proceso de acoplamiento se llevó a cabo a pH 5 con 15,4 μ l de buffer acetato 1 M. Para la desorción se usó 1 mL de Tritón X-100;

^(b) Área superficial = 0,2 m²;

^(c) Concentración = 3,58 mg/mL.

Tabla 4.12. Unión covalente de FRA sobre las partículas con funcionalidad acetal A2. Recetas, densidades superficiales (Γ_{FRA}) y fracciones unidas covalentemente.

		Muestra				
		1	2	3	4	5
Receta común ^(a)						
Látex A2 ^(b) (mL)		0,294	0,294	0,294	0,294	0,294
H ₂ O (mL)		1,106	0,850	0,594	0,338	0,082
Solución de FRA ^(c) (mL)		-	0,256	0,512	0,768	1,024
C _{FRA} ^o (mg/mL)		-	0,3	0,6	0,9	1,2
Experimento						
11 (pH 5)	Γ_{FRA} (mg/m ²)	-	1,52	2,21	3,04	3,72
	% FRA Unida Covalentemente	-	80	85	82	74
	% FRA Unida Cov/ Adicionada	-	73	53	48	44

^(a) Para el proceso de activación de los grupos acetal se usó 20 μ l de HCl 0,5 M. El proceso de acoplamiento se llevó a cabo a pH 5 con 15,4 μ l de buffer acetato 1 M. Para la desorción se usó 1 mL de Tritón X-100.

^(b) Área superficial = 0,2 m².

^(c) Concentración = 1,64 mg/mL.

Tabla 4.13. Unión covalente de CP1 sobre las partículas con funcionalidad acetal A1. Recetas, densidades superficiales (Γ_{CP1}) y fracciones unidas covalentemente.

		Muestra				
		1	2	3	4	5
Receta común ^(a)						
	Látex A1 ^(b) (mL)	0,654	0,654	0,654	0,654	0,654
	H ₂ O (mL)	0,746	0,669	0,592	0,514	0,437
	Solución de CP1 ^(c) (mL)	-	0,077	0,154	0,232	0,309
	C _{CP1} ^o (mg/mL)	-	0,3	0,6	0,9	1,2
Experimento						
12 (pH 5)	Γ_{CP1} (mg/m ²)	-	1,31	2,08	2,30	3,70
	% CP1 Unida Covalentemente		64	61	68	81
	% CP1 Unida Cov/ Adicionada		62	49	47	44

^(a) Para el proceso de activación de los grupos acetal se usó 20 μ l de HCl 0,5 M. El proceso de acoplamiento se llevó a cabo a pH 5 con 15,4 μ l de buffer acetato 1 M con. Para la desorción se usó 1 mL de Tritón X-100.

^(b) Área superficial = 0,2 m².

^(c) Concentración = 5,44 mg/mL.

Tabla 4.14. Unión covalente de CP1 sobre las partículas con funcionalidad acetal A2. Recetas, densidades superficiales (Γ_{CP1}) y fracciones unidas covalentemente.

		Muestra				
		1	2	3	4	5
Receta común ^(a)						
	Látex A2 ^(b) (mL)	0,294	0,294	0,294	0,294	0,294
	H ₂ O (mL)	1,106	1,029	0,952	0,874	0,797
	Solución de CP1 ^(c) (mL)	-	0,077	0,154	0,232	0,309
	C _{CP1} ^o (mg/mL)	-	0,3	0,6	0,9	1,2
Experimento						
13 (pH 5)	Γ_{CP1} (mg/m ²)	-	1,34	2,54	2,75	3,96
	% CP1 Unida Covalentemente		68	71	66	75
	% CP1 Unida Cov/ Adicionada		64	60	44	47

^(a) Para el proceso de activación de los grupos acetal se usó 20 μ l de HCl 0,5 M. El proceso de acoplamiento se llevó a cabo a pH 5 con 15,4 μ l de buffer acetato 1 M. Para la desorción se usó 1 mL de Tritón X-100.

^(b) Área superficial = 0,2 m².

^(c) Concentración = 5,44 mg/mL.

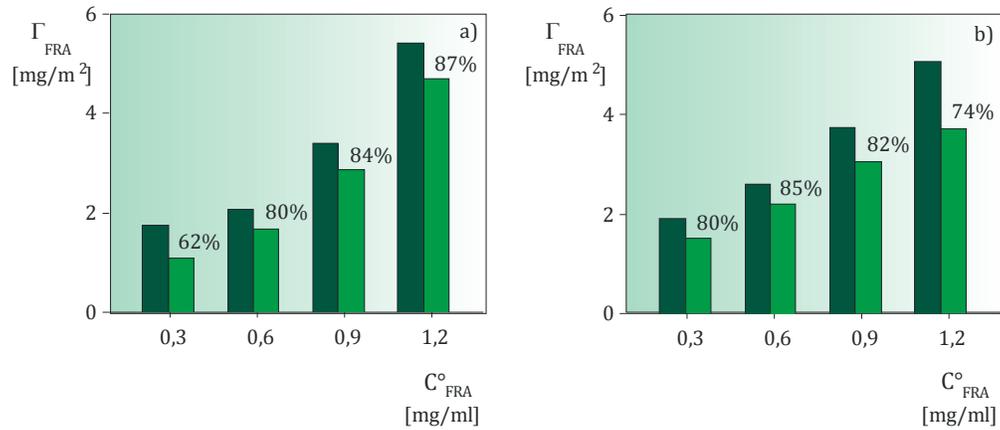


Figura 4.12. Unión covalente de FRA sobre las partículas con funcionalidad acetal a pH 5. a) complejo A1-FRA; b) complejo A2-FRA. Proteína unida total (barra verde oscuro) y proteína unida covalentemente (barra verde claro) en función de la concentración de proteína inicial. El porcentaje sobre la barra verde claro indica la fracción de proteína unida covalentemente.

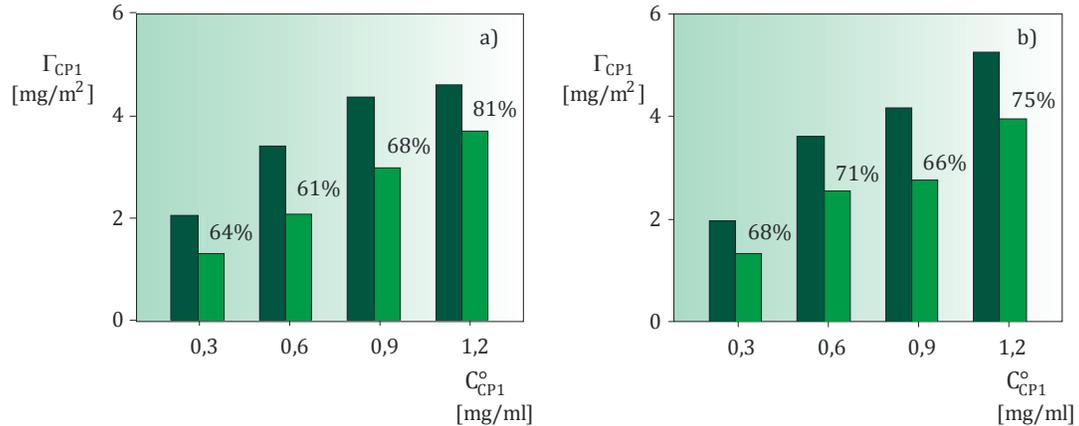


Figura 4.13. Unión covalente de CP1 sobre las partículas A1 (a) y A2 (b) a pH 5. Proteína unida total (barra verde oscuro) y proteína unida covalentemente (barra verde claro) en función de la concentración de proteína inicial. El porcentaje sobre la barra verde claro indica la fracción de proteína unida covalentemente.

Se intentó encontrar alguna dependencia entre la cantidad de grupos acetal superficiales y la cantidad de proteína unida covalentemente. El látex A2 tiene una densidad de grupos acetal ($6,28 \times 10^{-8}$ mEq/cm²) mayor que el látex A1 ($3,21 \times 10^{-8}$ mEq/cm²), y como era de esperar, fue capaz de ligar covalentemente una mayor cantidad de proteína sobre su superficie. Sin embargo, el aumento en la cantidad de proteína unida no fue proporcional al aumento en la densidad de grupos funcionales superficiales.

En la Tabla 4.15 se muestra la relación entre la cantidad de grupos acetal y la cantidad de proteína unida covalentemente a medida que aumenta la C_{Prot}° . Los resultados coinciden cualitativamente con los obtenidos con los látex carboxilados (Tabla 4.9), en el sentido que a medida que C_{Prot}° aumenta, la relación disminuye.

Para el caso del látex A1 y para $C_{\text{Prot}}^{\circ}=1,2$ mg/mL, la relación es cercana a la unidad, lo que estaría indicando que la mayor parte de los grupos funcionales superficiales han reaccionado con los Ag, FRA y CP1, durante el proceso de sensibilización, produciendo un alto grado de recubrimiento de la superficie de las partículas de látex con las proteínas. Esta relación, es menor para la CP1 (19 kDa) que posee menor tamaño que la FRA (28 kDa).

Para el látex A2, cuya densidad de grupos acetal es el doble del látex A1, la relación es mayor a 3, lo que estaría indicando que una buena parte de los grupos superficiales han quedado sin reaccionar durante la sensibilización.

Tabla 4.15. Relación entre la cantidad de grupos acetal y la cantidad de proteína unida en función de C_{Prot}° (mg/mL).

Complejo	Relación			
	$C_{\text{Prot}}^{\circ} = 0,3$	$C_{\text{Prot}}^{\circ} = 0,6$	$C_{\text{Prot}}^{\circ} = 0,9$	$C_{\text{Prot}}^{\circ} = 1,2$
A1-FRA	8,24	5,38	3,14	1,91
A2-FRA	11,54	7,95	5,78	4,73
A1-CP1	4,67	2,93	2,06	1,65
A2-CP1	8,89	4,69	4,33	3,01

Finalmente, con el objeto de estudiar el efecto del empleo de un agente reductor sobre las iminas formadas al reaccionar los grupos acetal superficiales presentes en las partículas de látex y las proteínas durante la unión covalente, se prepararon complejos látex-proteína usando el látex A1 y las proteínas CP1 y FRA, como se indica esquemáticamente en la Fig. 4.14. Luego de que las partículas se activaron con HCl a pH 2

y se sensibilizaron con las distintas proteínas, los complejos se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con BH_4Na en una proporción de 10 mg/m², a fin de producir la reducción de los dobles enlaces inestables presentes en las iminas. Los complejos obtenidos fueron posteriormente utilizados en los inmunoensayos a fines comparativos.

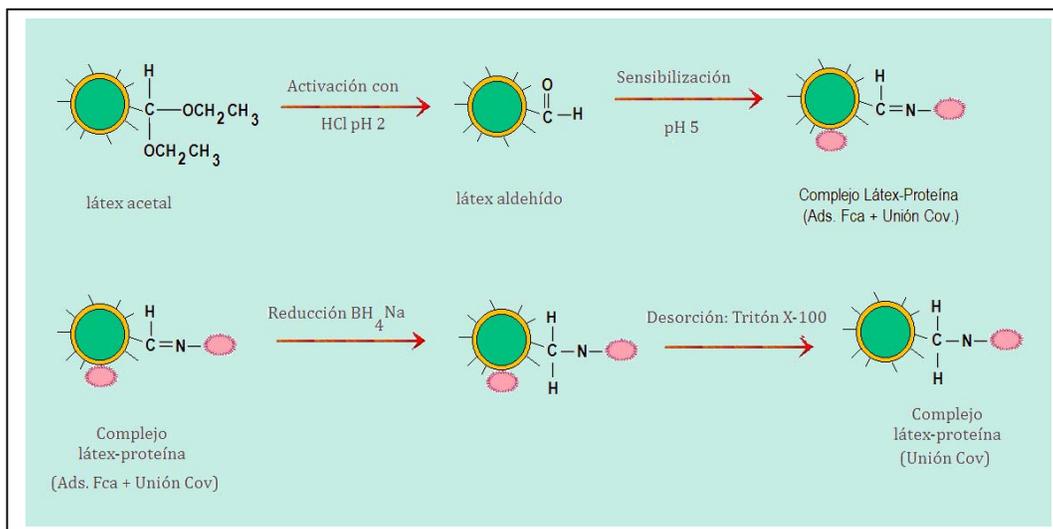


Figura 4.14. Esquema del proceso involucrado en la unión covalente de la proteína con los grupos acetal superficiales de partículas, en presencia del agente reductor BH_4Na .

4.4. Caracterización de los Complejos Látex-Proteína

4.4.1. Determinación de la Concentración Crítica de Coagulación de los Complejos Látex-Proteína

Se utilizó el procedimiento descrito previamente en el Capítulo 2, apartado 2.2.5, para la determinación de la *c.c.c.* a $\text{pH } 8$ (al que se realizarán los inmunoensayos) por DLS a 90° .

Como en el Capítulo 2, la *c.c.c.* se determinó como la concentración de KBr a la cual el diámetro de partícula resulta un 10% mayor al obtenido en medio acuoso (a Fuerza Iónica cero). En la Fig. 4.15 se representa el diámetro de partícula obtenido por DLS a 90° frente a la concentración de KBr para el complejo látex A1-FRA; y en la Tabla 4.16 se muestran los valores de *c.c.c.* obtenidos para los distintos complejos: R2-FRA; R2-CP1;

A1-FRA y A1-CP1. A efectos comparativos, se muestran también los resultados de *c.c.c* obtenidos para los látex sin sensibilizar.

Nótese que los complejos látex-proteína obtenidos a partir del látex carboxilado R2 mostraron mayor estabilidad que los obtenidos a partir del látex acetal A1. Los valores de *c.c.c.* de los complejos látex-proteína fueron menores que los correspondientes a los látex sin sensibilizar. En particular, los complejos látex-proteína obtenidos a partir del látex A1 mostraron una *c.c.c.* muy baja, que incluso es menor a la fuerza iónica del suero sanguíneo (150 mM). La baja estabilidad de estos complejos podría hacer que los mismos aglutinen al entrar en contacto con el suero, aún en ausencia de anticuerpos. Por lo tanto, estos complejos podrían no ser aptos para ensayos de inmunoaglutinación.

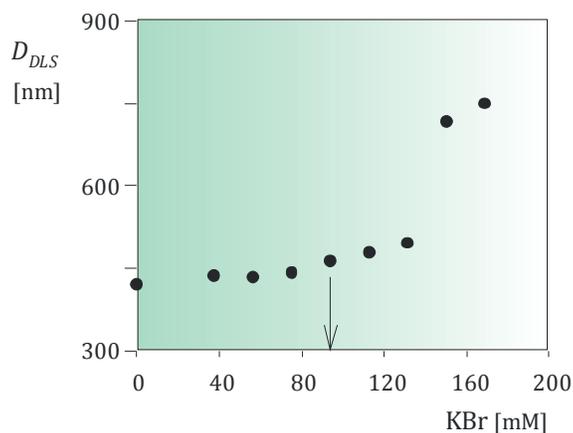


Figura 4.15. Determinación de la *c.c.c* por DLS a 90°. Diámetro de partícula del complejo A1-FRA frente a la concentración de KBr.

Tabla 4.16. Valores de *c.c.c.* a pH 8 obtenidos por DLS a 90° para los distintos complejos.

	R2	R2-FRA	R2-CP1	A1	A1-FRA	A1-CP1
<i>c.c.c.</i> [mM KBr]	300	175	200	150	100	≤ 40

4.4.2. Análisis de los Complejos Látex-Proteína Mediante MDLS

Las mediciones del diámetro de los complejos por MDLS se llevaron a cabo a

30°C, y a los siguientes ángulos de detección: 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 100°, 110°, 120°, 130°, y 140°. La concentración de las partículas se ajustó a cada ángulo de medición hasta obtener alrededor de 2×10^5 cuentas/s para asegurar dispersión de luz simple; y los tiempos de medición variaron entre 100 y 200 segundos (Vega *et al.*, 2003b).

El diámetro promedio de DLS experimental se calculó, para cada uno de los látex sintetizados, a través del método de los cumulantes cuadrático (Koppel, 1972). En la Fig. 4.16 se representan los diámetros promedio a cada ángulo de detección del látex R2 sin sensibilizar y sensibilizado con la proteína recombinante quimérica CP1 expresada en el vector pET24a y pET32a. Se observa que las curvas siguen una tendencia similar pero con un ligero desplazamiento hacia diámetros mayores cuando el látex se encuentra sensibilizado, lo que estaría indicando que la polidispersidad (PSD) no cambia de forma y que no hay una coagulación sustancial de partículas durante la sensibilización. Además, se observa que cuando la proteína antigénica CP1 se encuentra expresada en el vector pET32a, el diámetro resulta mayor, lo que es de esperar debido al mayor peso molecular que presenta esta proteína (expresión de la proteína de fusión TRX).

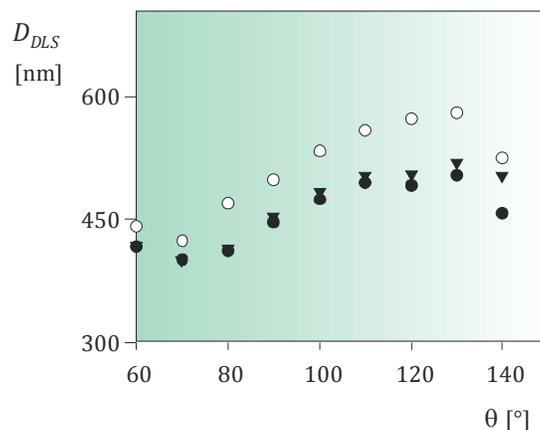


Figura 4.16. Diámetros promedio de DLS en función del ángulo de detección para el látex R2 (●) y para los complejos R2-CP1 (pET24a) (▼) y R2-CP1 (pET32a) (○).

4.4.3. Análisis de los Complejos Látex-Proteína por Turbidimetría

Las mediciones de Absorbancia (A) se efectuaron en un espectrofotómetro UV-vis Perkin Elmer Lambda 25 a temperatura ambiente, y a longitudes de onda entre 400 y 800 nm. Para evitar la dispersión múltiple, el látex se diluyó hasta obtener una absorbancia igual a 1 a 300 nm. Los diámetros y las absorbancias promedio se calcularon a partir del espectro de turbidez.

En la Fig. 4.17 se muestran los resultados obtenidos para distintos complejos R2-CP1 en pET32a con distinta cantidad de proteína unida. Se observa que a medida que aumenta la cantidad de proteína unida covalentemente a la superficie de las partículas, la absorbancia de los complejos látex-proteína aumenta siguiendo una tendencia similar a partir de $\lambda = 500$.

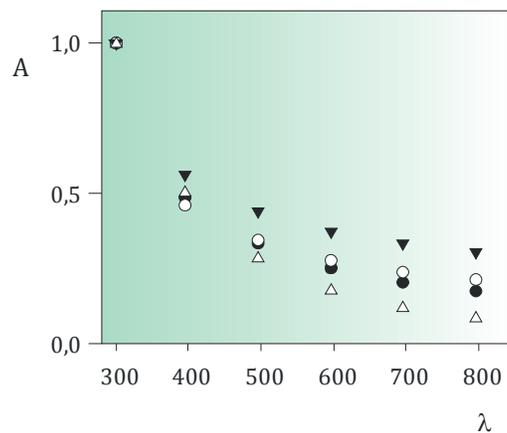


Figura 4.17. Espectro de Absorbancia en función de la longitud de onda para el látex R2 sin sensibilizar y de los complejos R2-CP1 (pET32a) a distintas concentraciones de proteína unida covalentemente: (Δ) R2; (●) 1,65 mg/mL; (○) 2,46 mg/mL; (▼) 2,64 mg/mL

4.5. CONCLUSIONES

Luego de sintetizar y caracterizar los látex funcionalizados, el paso siguiente para la formación de los complejos látex-proteína es su sensibilización con la proteína antigénica de interés. En primer lugar, se estudió la adsorción física y se observó lo siguiente:

- En general, la máxima adsorción de las proteínas recombinantes estudiadas se produjo a pH 5, cerca de su pI y a través de interacciones hidrofóbicas, debido a que se minimizan las repulsiones electrostáticas intra- e intermoleculares.

- Las isotermas de adsorción del Homogenato del *T. cruzi* sobre las partículas de PS mostraron la máxima adsorción a pH 5, cerca del pI de la mezcla de proteínas. Sin embargo, la mayor pendiente se observó a pH 9. Esto puede deberse a que, como el Homogenato del *T. cruzi* es una mezcla de proteínas, la fracción adsorbida a pH 9 (con carga neta cero a ese pH), exhiba mayor afinidad por la superficie de la partícula que la fracción remanente adsorbida a otros pH.

Posteriormente, se prepararon los complejos látex-proteína mediante la unión química de las distintas proteínas antigénicas del *T. cruzi* sobre el látex carboxilado R2 a pH 5 y a pH 7. Los principales resultados obtenidos fueron:

- Para el Homogenato del *T. cruzi*, la fracción de proteína químicamente unida es relativamente baja (menor al 50%) y cae ligeramente con el incremento de la C_{Hom}° . Esto puede deberse a un impedimento estérico de las proteínas de mayor tamaño, que pueden ocluir grupos reactivos de la superficie de la partícula y/o a las distintas reactividades de las proteínas en función de su estructura en solución. Además, no se observó dependencia de la proteína unida covalentemente con el pH, lo que puede deberse a que se trata de una mezcla indefinida de proteínas cuyos pI varían de 5,9 a 6,3.

- En el caso de las proteínas recombinantes, en el rango de concentraciones investigado, se observa que al aumentar la concentración de proteína adicionada aumenta tanto la proteína total unida como la proteína ligada covalentemente. Sin embargo, la relación entre la proteína unida covalentemente y la proteína adicionada disminuye al aumentar la concentración de proteína adicionada, debido a la saturación de los grupos carboxilos superficiales.

- En el caso de las proteínas recombinantes, se observó además que la mayor cantidad de proteína unida a los grupos carboxilo fue a pH = 5, próximo al pI teórico de las distintas proteínas.

- El alto nivel de acoplamiento covalente observado quizás haga innecesaria la etapa de desorción, simplificando el proceso y reduciendo el riesgo de desnaturalización de las proteínas por agregado de emulsificante.

Los ensayos de unión covalente sobre látex con funcionalidad acetal (A1 y A2) se llevaron a cabo con las proteínas recombinantes FRA y CP1 expresada en pET24a. Los resultados obtenidos mostraron lo siguiente:

- En todos los casos se observó que, al aumentar la concentración de proteína adicionada, se incrementa la cantidad de proteína total unida y la cantidad de proteína ligada covalentemente.

- El látex A2, con una densidad de grupos acetal mayor que el látex A1, ligó covalentemente una mayor cantidad de proteína sobre su superficie. Sin embargo, este aumento en la cantidad de proteína unida no fue proporcional al aumento en la densidad de grupos funcionales superficiales.

- A medida que la C_{Prot}° aumentó, la relación entre la cantidad de grupos acetal y la cantidad de proteína unida covalentemente disminuyó. Estos resultados coinciden cualitativamente con los obtenidos con el látex carboxilado.

Finalmente, se caracterizaron los complejos látex-proteína y se observó que:

- Los complejos látex-proteína obtenidos a partir del látex carboxilado R2 mostraron mayor estabilidad que los obtenidos a partir del látex acetal A1.

- Los valores de *c.c.c.* de los complejos látex-proteína fueron menores que los correspondientes a los látex sin sensibilizar. En particular, los complejos látex-proteína obtenidos a partir del látex A1 mostraron una *c.c.c.* muy baja, lo que podría dificultar su utilización en ensayos de inmunoaglutinación.
- Durante el análisis por MDLS, las evoluciones de los D_{DLS} en función del ángulo de detección de los complejos látex-proteína fueron similares a las del látex sin sensibilizar, pero con un ligero desplazamiento hacia diámetros mayores. Esto estaría indicando que la PSD no cambia de forma y que no hay una aglomeración sustancial de partículas durante la sensibilización.
- En el análisis por T, se pudo observar que a medida que aumenta la cantidad de proteína unida covalentemente a la superficie de las partículas, la absorbancia de los complejos látex-proteína aumenta, resultando espectros con una tendencia similar.

CAPÍTULO 5:

APLICACION DE LOS DISTINTOS COMPLEJOS LATEX-PROTEINA EN ENSAYOS DE INMUNOAGLUTINACION

5.1. INTRODUCCION

Actualmente, en la rama de la salud, se experimentan cambios profundos en busca de nuevos reactivos que permitan el diagnóstico “al pie del paciente” y la implementación de terapéuticas en corto tiempo, así como el seguimiento clínico y epidemiológico de las enfermedades.

La Enfermedad de Chagas es una infección parasitaria producida por el *T. cruzi* y constituye un problema grave de salud pública ya que cerca de 20 millones de personas están infectadas sólo en América Latina. Además, debido a que aún no se ha desarrollado una vacuna eficaz para prevenir la enfermedad, las estrategias para su control tratan de disminuir la transmisión; por lo que es muy importante realizar un buen diagnóstico para avanzar en el tratamiento del paciente infectado y evitar la diseminación de la enfermedad.

Uno de los problemas claves con relación a la Enfermedad de Chagas es el diagnóstico. Sin diagnóstico efectivo no se pueden identificar y por ende tratar a los individuos infectados, y la eficacia del tratamiento específico es difícil de evaluar. Más aún,

la efectividad de cualquier campaña de control, ya sea dirigida a vectores, bloqueo de la transmisión o vacunación de poblaciones, no puede ser medida sin un competente sistema de diagnóstico.

Los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de diagnóstico, pueden presentar cierta discordancia. Debido a ello, sólo se consideran un dato auxiliar para el diagnóstico, y los informes deben ser considerados en términos de probabilidad. El criterio recomendado por el Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chaben, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), es que el resultado del inmunodiagnóstico deberá confirmarse con un mínimo de 2 de los métodos inmunológicos utilizados.

El diagnóstico de la Enfermedad de Chagas puede estar basado en la detección de parásitos en sangre por métodos parasitológicos directos o indirectos (fase aguda), o en la detección de Ac IgG anti-*T.cruzi* por métodos serológicos (fase crónica).

Los procedimientos para realizar un diagnóstico parasitológico específico (xenodiagnóstico o cultivo de sangre) son poco sensibles, muy laboriosos y demandan varias semanas para completarse; y además, durante la etapa crónica de la enfermedad, los parásitos son raramente detectados en sangre (Mendes *et al.*, 1997). Debido a esto, se ha intentado desarrollar inmunoensayos basados en la detección de anticuerpos que tengan la sensibilidad de las pruebas convencionales y que sean altamente específicos, pero sencillos de realizar para el diagnóstico en el estadio crónico de la Enfermedad de Chagas (Goldenberg *et al.*, 1991; Tanowitz *et al.*, 1992; Goldenberg *et al.*, 1998; Kirchhoff *et al.*, 2001; Reed *et al.*, 2001; Zrein, 2002; Tarleton *et al.*, 2005; Kirchhoff *et al.*, 2004; Shah, *et al.*, 2008; Houghton, *et al.*, 2008).

En la actualidad, las reacciones serológicas más utilizadas en la práctica clínica

son: Hemaglutinación Indirecta (HAI), Inmunoensayo Enzimático (ELISA) e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Estas técnicas presentan alta sensibilidad y especificidad, pero tienen ciertas desventajas: i) la realización de los ensayos tarda entre 90 y 100 minutos; ii) la IFI requiere de un microscopio especial, consta de varias fases, la interpretación es subjetiva y no se recomienda su utilización para el análisis de un gran número de muestras; y iii) la prueba de ELISA consta de varias etapas y requiere de kits relativamente caros.

Un método de detección alternativo, es el ensayo de inmunoaglutinación (IA), donde se utilizan partículas de látex como soporte para la fijación de antígenos (Ag), de manera tal de amplificar la reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) que se produce en el inmunoensayo (Cambiaso *et al.*, 1992; Molina-Bolivar *et al.*, 1998; Quesada *et al.*, 1998; Borque *et al.*, 2000; Kawaguchi; 2000; Gibanel *et al.*, 2001; Peula-Garcia *et al.*, 2002; Slomkowski *et al.*, 2002; Gonzalez *et al.*, 2008; Gonzalez *et al.*, 2010). Este método resulta rápido, es de sencilla realización e interpretación, presenta relativamente alta sensibilidad analítica, es especialmente útil en aquellos laboratorios con escaso personal y equipamiento y, en principio, permitiría realizar el diagnóstico al pie del paciente. Una representación esquemática del proceso de IA se muestra en la Fig. 5.1.

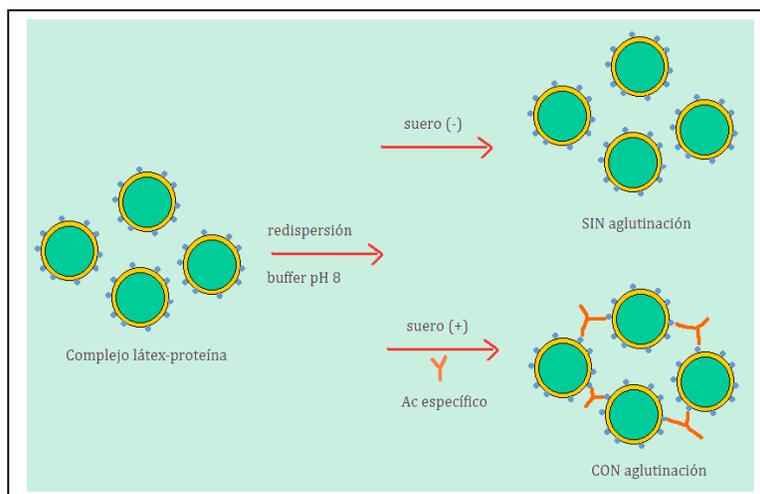


Figura 5.1. Proceso de inmunoaglutinación.

Si bien se puede emplear el método visual para la detección y seguimiento de la reacción de aglutinación (Quast *et al.*, 1978; Kitano *et al.*, 1987; Okubo *et al.*, 1987; Basinska y Slomkowski; 1993; Peula *et al.*, 1994), los métodos basados en técnicas instrumentales como turbidimetría (Litchfield *et al.*, 1984; Peula *et al.*, 1995; Ortega-Vinuesa *et al.*, 1996), nefelometría (Kapmeyer *et al.*, 1988; Montagne *et al.*, 1992; Sarobe *et al.*, 1996) y DLS (Cohen y Benedek, 1975) permiten en general una mayor objetividad, sensibilidad y exactitud, aunque éstas varían en función del método utilizado para detectar la aglutinación.

En la presente Tesis, la reacción de IA se detectará principalmente por turbidimetría, es decir, midiendo los cambios de absorbancia en un espectofotómetro convencional. Esta técnica, proporciona alta sensibilidad y requiere pequeños volúmenes de muestra. Además, puede permitir la automatización del ensayo y elimina la subjetividad del operador. Sin embargo, a efectos comparativos, se utilizará también la técnica visual.

El éxito del inmunoensayo está determinado por la especificidad y la sensibilidad del método. A su vez, estos parámetros dependen de las características del Ag presente sobre la superficie de la partícula sensibilizada, de las características del suero y del método de detección de la reacción Ag-Ac.

La especificidad del inmunoensayo está determinada por las características de las partículas sensibilizadas y por las características del suero, ya que ambos elementos participan del evento de biorreconocimiento superficial. En relación a la especificidad del Ac, ésta depende de la afinidad por el Ag específico presente en la superficie de las partículas. En cuanto a las características del suero, éste puede presentar interferentes para el evento de biorreconocimiento, afectando tanto la especificidad como la sensibilidad. Por otra parte, el uso de partículas sensibilizadas, en la que el elemento de

reconocimiento se obtenga mediante técnicas recombinantes, mejora significativamente la especificidad (da Silveira *et al.*, 2001; Manes *et al.*, 2005). Si el inmunoensayo se aplica en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, una alta especificidad implica un número bajo de falsos positivos (Andreotti *et al.*, 2003).

La sensibilidad es otra característica esencial para un inmunoensayo y depende de la capacidad de discriminar entre la señal del blanco y de la muestra a baja concentración de analito. En consecuencia, está relacionada al modo de detección de la inmunoreacción. Si el inmunoensayo se aplica al diagnóstico de enfermedades infecciosas, una alta sensibilidad implica un número bajo de falsos negativos (Andreotti *et al.*, 2003).

La optimización de tiempo, temperatura, concentración, pH, fuerza iónica, presencia de aditivos y calidad de reactivos, son parámetros clave que afectan la respuesta del inmunoensayo. Cada uno de estos parámetros, deben ser examinados y optimizados, ya que determinan el éxito del método de diagnóstico (Andreotti *et al.*, 2003).

El objetivo final de la Tesis es la obtención de partículas de látex sensibilizadas con antígenos del *T. cruzi*, que pueden actuar como reactivo de IA para detectar la Enfermedad de Chagas. En primer lugar, se buscarán las condiciones en las cuales el ensayo presenta mayor sensibilidad para la detección de Ac contra el *T. cruzi*. Posteriormente, se analizará un panel de sueros clasificados como “positivos” o “negativos” tomando como referencia las técnicas de ELISA y HAI, con el objeto de evaluar la sensibilidad y especificidad del ensayo.

5.2. TRABAJO EXPERIMENTAL

Los ensayos de IA se realizaron sobre la base de los complejos látex-proteína sintetizados en el Capítulo 4. Se trabajó primero con los complejos basados en los látex carboxilados y luego con los basados en los látex con funcionalidad acetal.

5.2.1. Aplicación de los Látex con Funcionalidad Carboxilo

5.2.1.1. Estudio de la Influencia de las Condiciones de Reacción Utilizando Sueros Control

El objetivo de este estudio fue determinar las condiciones en las cuales el inmunoensayo muestra mayor sensibilidad y especificidad. El inmunoensayo consistió en mezclar 950 μl de la suspensión del complejo látex-proteína, con 50 μl de suero que puede contener los Ac anti-*T. cruzi* (suero positivo) o no poseerlos (suero negativo), a diferentes concentraciones. La reacción de IA se detectó por turbidimetría (T), midiendo los incrementos en la absorbancia óptica (ΔA) a una longitud de onda de 570 nm, en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 25 UV/vis Spectrometer), después de 5 minutos de reacción. El incremento de absorbancia se determinó restando al correspondiente valor de absorbancia medido, el valor de absorbancia de un blanco. El blanco es el complejo látex-antígeno sin la adición del suero. Las mediciones de absorbancia del blanco, deben ser constantes a lo largo del tiempo, lo que es indicativo de la estabilidad del complejo látex-antígeno en el medio en el que se realiza el inmunoensayo. Esta condición es requerida para que un complejo se considere apto para ser utilizado en ensayos de IA.

5.2.1.1.a. Influencia del Tiempo de Reacción

El tiempo de reacción (t) se define como el tiempo transcurrido entre la mezcla del suero con el complejo látex-proteína y la lectura de la absorbancia.

En primer lugar y en base a la bibliografía existente, se decidió establecer un tiempo de reacción de 5 minutos, analizándose la evolución de ΔA en función de t. Como queda reflejado en la Fig. 5.2, donde se utilizó el complejo R2-FRA con 4,53 mg/mL de proteína unida covalentemente, la respuesta del suero positivo se diferencia claramente de la respuesta del suero negativo desde el comienzo de la reacción (t=0).

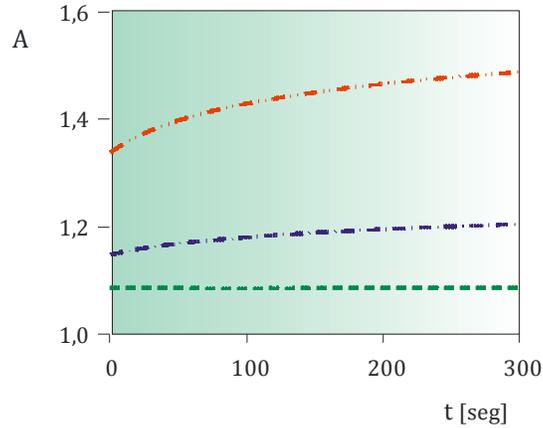


Figura 5.2. Influencia del tiempo de reacción durante el ensayo de IA, utilizando los sueros controles. Evolución de la absorbancia del complejo R2-FRA (4,53 mg/m²) en ausencia del suero (---) y después de mezclarlo con suero positivo (---) o suero negativo (---).

En base a los resultados obtenidos, se analizó la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ dentro de los primeros 5 minutos para distintas concentraciones de proteína FRA ligada covalentemente, donde $\Delta A(+)$ y $\Delta A(-)$ son las diferencias de absorbancia del complejo látex-proteína en presencia del suero positivo y del suero negativo respecto a la absorbancia del complejo en ausencia de suero, respectivamente. Como se observa en la Fig. 5.3, la relación se mantiene prácticamente constante, lo que hace pensar que la reacción Ag-Ac ocurre muy rápidamente cuando entran en contacto las partículas de látex sensibilizadas y el suero positivo.

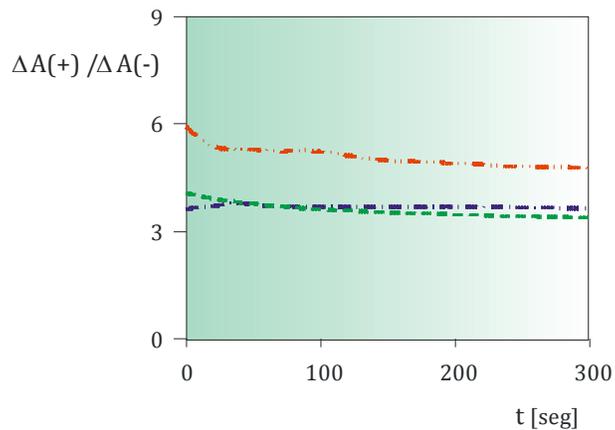


Figura 5.3. Influencia del tiempo de reacción durante el ensayo de IA utilizando los sueros controles y el complejo R2-FRA. Evolución de la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ para concentraciones crecientes de proteína unida covalentemente: 2,97 mg/m² (---); 3,77 mg/m² (---); y 4,53 mg/m² (---).

Cuando la concentración de proteína unida es de 3,77 mg/m², el valor de $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ es mayor respecto a las otras concentraciones analizadas, lo que estaría indicando que la concentración de proteína unida, tendría un efecto significativo sobre la respuesta obtenida en el ensayo de IA. Este efecto, se analizará luego con mayor profundidad.

Posteriormente, se analizó la respuesta obtenida a tiempos de reacción mayores a los 5 minutos. Como se ve en la Fig. 5.4, a medida que el tiempo de reacción aumenta, la respuesta del suero positivo se mantiene prácticamente constante; pero la del suero negativo aumenta, haciendo cada vez menor la discriminación entre los sueros positivo y negativo. Después de 5 minutos, las muestras negativas pueden dar una señal similar a una muestra positiva, lo que genera un aumento en el número de falsos positivos, y por ende una disminución de la especificidad del ensayo.

Como consecuencia de los resultados obtenidos, establecimos como tiempo de reacción 5 minutos, debido a que con estas condiciones se obtiene una buena discriminación entre la respuesta del suero control positivo y la del negativo.

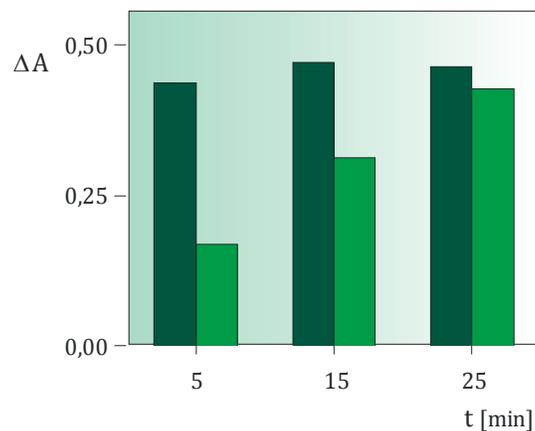


Figura 5.4. Influencia del tiempo de reacción durante el ensayo de IA utilizando los sueros controles. Respuesta obtenida con el complejo R2-FRA (4,53 mg/m²) a tiempos de reacción mayores a los 5 minutos. La barra verde oscuro representa la respuesta con el suero positivo y la verde clara la respuesta con el suero negativo.

5.2.1.1.b. Influencia de la Fuerza Iónica del Medio y de la Presencia de Aditivos

Para el estudio de las condiciones del buffer de reacción, se trabajó con los complejos S4-Hom, R2-CP1 y R2-Ag36. Estos complejos fueron diluidos en una disolución salina de BSA pH 8, sobre la cual se realizaron distintos agregados hasta encontrar las condiciones óptimas del medio que produzcan la mayor diferenciación entre sueros positivos y sueros negativos durante el inmunoensayo.

La disolución salina de BSA pH 8 contiene 0,5 mg/mL de BSA y 0,1% en peso de azida sódica (N_3Na), en un medio a pH 8 con un tampón borato 10 mM. La BSA es una proteína inerte que se adiciona con el fin de que se adsorba sobre los sitios hidrofóbicos de la superficie de las partículas para evitar reacciones inespecíficas; y la azida sódica es un agente antimicrobiano que impide la contaminación del reactivo con microorganismos.

Se trabajó con sueros controles. El suero control negativo (-) corresponde a un individuo sano y el suero control positivo (+) corresponde a un individuo infectado con altos niveles de Ac anti *T. cruzi*, que fueron detectados mediante un ensayo de ELISA preliminar. Ambos sueros, obtenidos de zonas endémicas del norte de la Provincia de Santa Fe, fueron centrifugados durante 10 minutos a 10.000 r.p.m. antes de su uso, a fin de eliminar las interferencias propias del mismo.

La Fig. 5.5 muestra los ΔA obtenidos con el complejo R2-CP1, después de 5 minutos de reacción. Se trabajó a fuerza iónica (I) baja (10 mM) y alta o similar a la fisiológica (150 mM), y a diferentes concentraciones del suero. Además, se analizó el efecto de dos agentes bloqueantes: i) Tween 20 al 1% ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$, emulsificante polisorbato no iónico); y ii) Glicina 0,1 M (aminoácido); tanto en forma separada como conjunta, para ver si se producía un efecto potenciador.

Mediante el uso de agentes bloqueantes es posible reducir interferencias no deseadas en los ensayos, suprimiendo las uniones de baja y media afinidad, sin afectar negativamente las uniones específicas y de alta afinidad. Sin embargo, el principal objetivo de estos agentes es bloquear los sitios libres de las partículas, es decir, aquellos no ocupados por las proteínas antigénicas inmovilizadas durante la sensibilización. De esta manera, el Ac presente en el suero al que será expuesto posteriormente el complejo látex-proteína, tiene mayor posibilidad de unirse específicamente al Ag, y se evita su unión de manera inespecífica sobre la superficie de la partícula. El agente bloqueante elegido no debe eclipsar a la proteína unida a la superficie y debe expresar la especie iónica adecuada para poder interactuar con la superficie.

La mayor discriminación entre sueros positivos y negativos se vio a baja I, con el suero sin diluir (mayor concentración de Ac), y en presencia de Glicina en el buffer de reacción. Esto puede deberse a que el Tween 20, es considerado un agente bloqueador temporal, debido a se puede eliminar mediante un lavado con agua o tampón acuoso, a diferencia de la Glicina que es considerada como bloqueador permanente.

En base a los resultados obtenidos, diferentes complejos látex-proteína se enfrentaron a diluciones seriadas del suero, trabajando con buffer de baja I, en presencia de Glicina ó Tween 20 (Fig. 5.6). En todos los complejos látex-proteína estudiados, la absorbancia del blanco (complejo látex-proteína en ausencia de suero) permaneció constante durante los inmunoensayos, por lo que se pueden considerar coloidalmente estables en las condiciones en las que se realizó el inmunoensayo. La mayor discriminación entre el suero (+) y el (-) se obtuvo con el complejo R2-CP1, con el suero sin diluir, y en presencia de Glicina en el buffer de reacción.

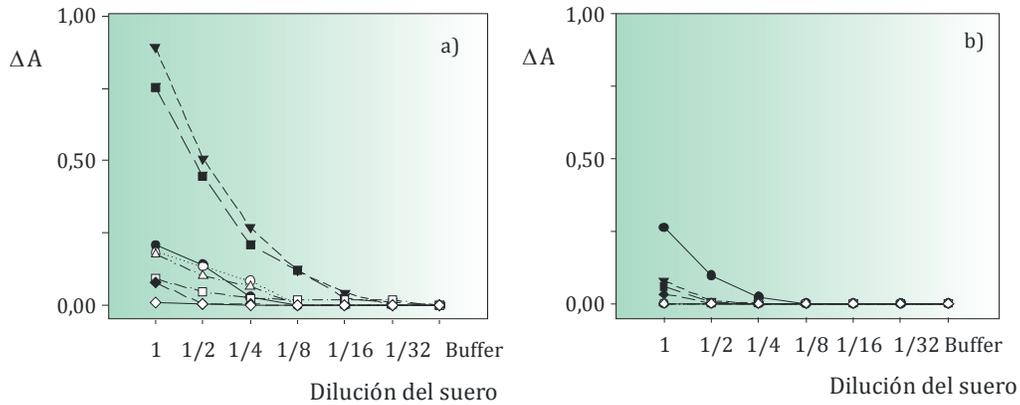


Figura 5.5. Variación de la absorbancia por adición de diferentes concentraciones de suero positivo (símbolos llenos) o suero negativo (símbolos vacíos), después de 5 minutos de reacción para el complejo R2-CP1 en presencia de Tween-20 (■); Glicina (▼); Tween-20 y Glicina (◆); y en ausencia de aditivos (●). a) baja fuerza iónica (10 mM); b) alta fuerza iónica (150 mM).

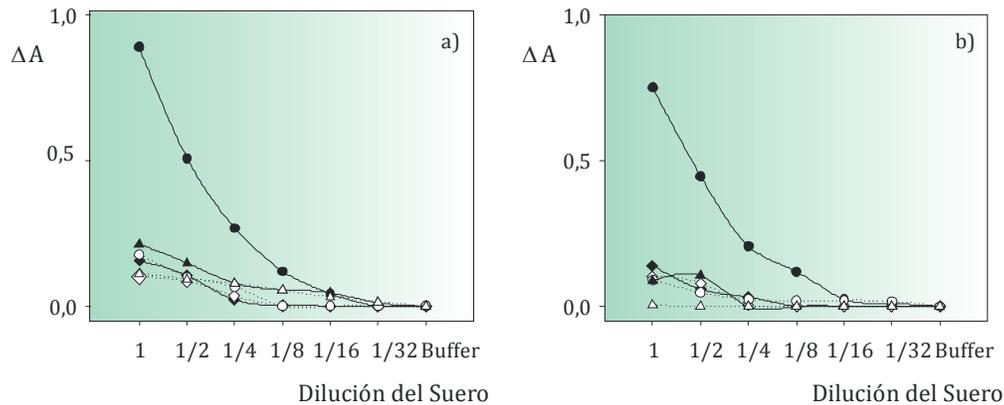


Figura 5.6. Variación de la absorbancia por adición de diferentes concentraciones de suero positivo (símbolos llenos) o suero negativo (símbolos vacíos) a baja fuerza iónica (10 mM) y después de 5 minutos de reacción para el complejo R2-Ag36 (▲); S4-Homogenato del *T. cruzi* (◆); y R2-CP1 (●). a) en presencia de Glicina; b) en presencia de Tween-20.

5.2.1.1.c. Influencia de la Concentración de Látex y de la Presencia de PEG

Se trabajó con el complejo R2-CP1 de 3,29 mg/m² de proteína unida para analizar la posibilidad de aumentar la discriminación entre sueros positivos y negativos. Para ello, al buffer utilizado para diluir los complejos látex-proteína durante el inmunoensayo (buffer borato pH 8, con agregado de BSA y azida sódica, I = 10 mM), se le adicionó 0,1 M de Glicina y polietilenglicol (PEG) 8000 3% w/v. El PEG aumenta la concentración efectiva de los reactivos en la solución por exclusión del volumen de

Solución (Miraballes-Martínez *et al.*, 1997); además favorece la interacción Ag-Ac debido a que permite una mejor exposición de los epítopes del Ag unido a la superficie de la partícula para que sean reconocidos por los Ac presentes en el suero. Se trabajó a dos concentraciones distintas de partículas para ver su efecto en el ensayo de IA.

En la Fig. 5.7 se muestran los resultados obtenidos con el complejo R2-CP1 ($3,29 \text{ mg/m}^2$). Cuando la concentración de partículas es baja ($1,56 \times 10^9$ partículas/mL), aumenta la ΔA (-), y disminuye la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$. Cuando la concentración de partículas es mayor ($3,11 \times 10^9$ partículas/mL, que corresponde a una $A \cong 1$), si bien ΔA disminuye, la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ aumenta, lo que permite una mejor discriminación entre el suero control positivo y el negativo. Trabajando en estas condiciones se minimizan las interferencias causadas por las características del suero, que no se eliminan durante su centrifugación.

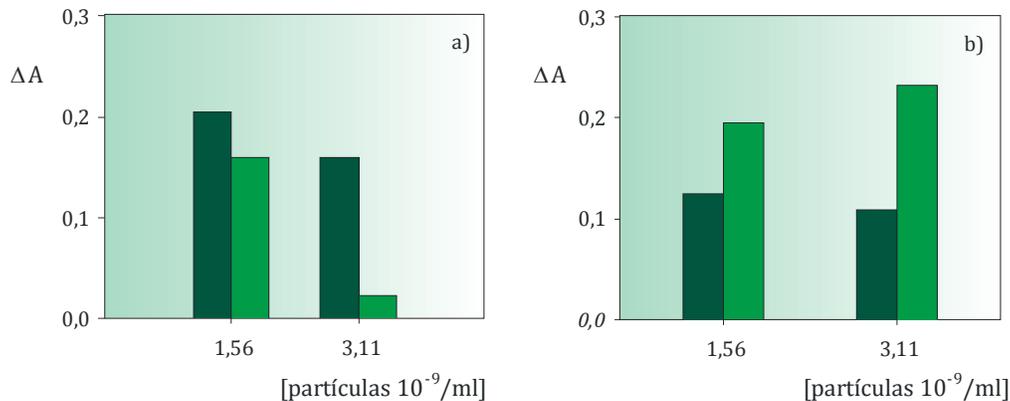


Figura 5.7. Efecto de la concentración de partículas y de la presencia de PEG en el buffer de reacción, en los ensayos de IA con el complejo R2-CP1. a) con PEG; b) sin PEG. La barra verde oscuro representa al suero positivo y la verde clara al suero negativo.

Por otro lado, cuando se trabajó en ausencia de PEG, se obtuvieron resultados contradictorios, ya que los complejos R2-CP1 mostraron mayor absorbancia frente al suero control negativo que frente al suero control positivo.

De lo antedicho se concluye que los mejores resultados se obtienen cuando el complejo R2-CP1 se enfrenta al suero sin diluir; en presencia de buffer borato pH 8 con $I = 10$ mM; conteniendo BSA (0,5 mg/mL), Glicina (0,1 M) y PEG (3% w/v), y trabajando a una concentración de partículas equivalente a 1 unidad de absorbancia ($3,11 \times 10^9$ partículas/mL en este caso).

5.2.1.2. Comparación de los Diferentes Complejos Látex-Proteína Bajo Distintas Condiciones Utilizando Sueros Control

5.2.1.2.a. Efecto de la Fuerza Iónica del Medio

Se analizó la influencia de la fuerza iónica del medio de reacción en el cual se lleva a cabo el inmunoensayo sobre la discriminación del suero control positivo y el suero control negativo, para los distintos complejos obtenidos con el látex R2 y diferentes proteínas antigénicas. La Fig. 5.8 muestra que, salvo en el caso del complejo R2-Ag36, la mayor discriminación entre el suero control positivo y el suero control negativo se obtuvo a I baja (10 mM). En estas condiciones, las cadenas poliméricas situadas en la superficie de las partículas, y que poseen los Ag unidos covalentemente, se encuentran extendidas hacia la solución, lo que permitiría que los Ag queden más expuestos para interactuar con los Ac presentes en el suero. En cambio, a I alta los Ag se encontrarían más cercanos a la superficie de las partículas, dificultando la interacción Ag-Ac por impedimento estérico o bien por oclusión del sitio activo del Ag. Por otra parte, a I baja, la estabilidad de los complejos látex-proteína es mayor ya que se encuentran cargados (carga negativa, proveniente de las proteínas y de los grupos SO_4^{2-} superficiales) evitando de este modo la aglutinación inespecífica.

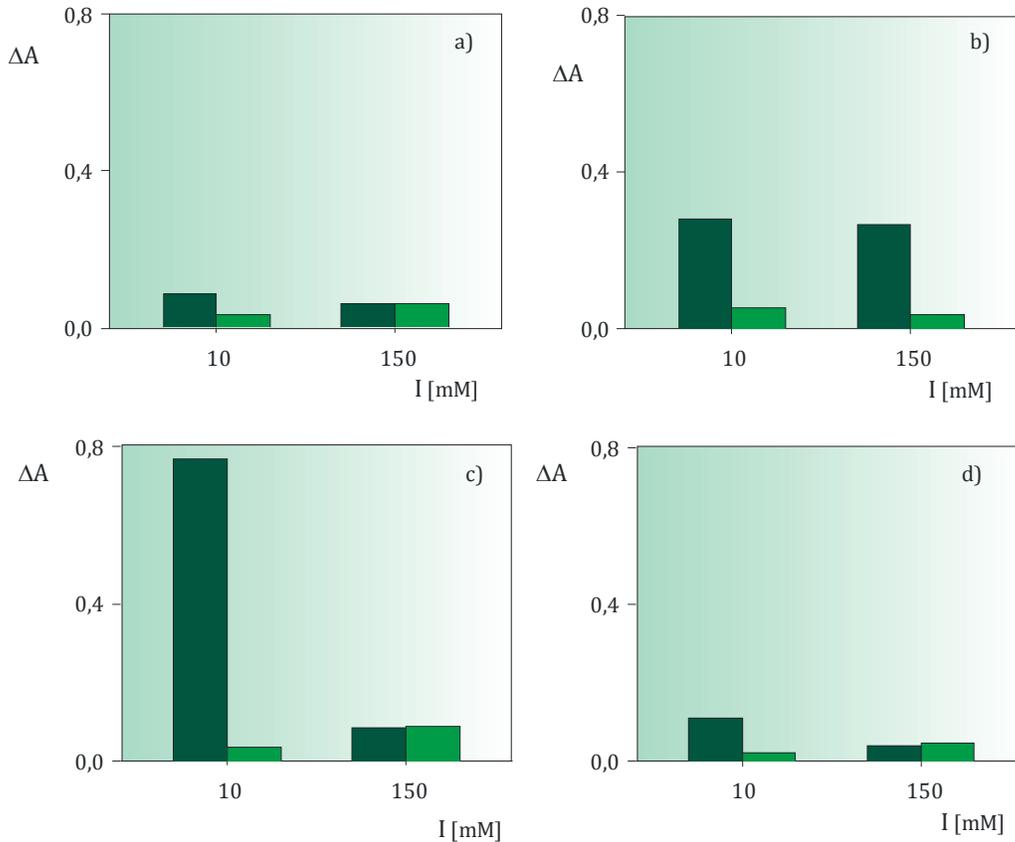


Figura 5.8. Influencia de la fuerza iónica del medio de reacción durante el ensayo de IA utilizando los sueros control y distintos complejos látex-proteína basados en el látex carboxilado R2. a) Homogenato del *T. cruzi* (0,95 mg/m²); b) Ag36 (3,98 mg/m²); c) FRA (4,53 mg/m²); d) CP1 (3,90 mg/m²). La barra verde oscuro representa al suero positivo y la verde clara al suero negativo.

5.2.1.2.b. Efecto de la Cantidad de Proteína Unida

Con el fin de estudiar la dependencia de la IA con el grado de recubrimiento de las partículas, se realizaron inmunoensayos con los complejos R2-FRA y R2-CP1 a distintas concentraciones de proteína unida, mostrándose los resultados en la Fig. 5.9.

A muy altas concentraciones de proteína unida covalentemente (zona de exceso de Ag), puede producirse la oclusión o apantallamiento de los sitios activos de las proteínas vecinas, o puede ocurrir que el Ac reaccione con Ag vecinos (situados sobre la misma partícula), lo que hace que disminuya la IA. A bajas concentraciones de proteína unida (zona de exceso de Ac), puede ser que se formen pequeños inmunocomplejos,

debido a que muchos de los sitios de unión al Ag presentes en los Ac quedan libres. Sobre esta base debería existir una relación Ag-Ac “óptima” que permita formar una amplia red de moléculas unidas de forma no covalente constituyendo la estructura característica de los procesos de aglutinación, que debería quedar reflejada en un aumento de la absorbancia (zona de equivalencia). Este comportamiento puede observarse en la Fig. 5.9, donde aparecen máximos en las “curvas” ΔA vs proteína unida, que son características de los procesos de aglutinación.

Además, se observó que no siempre la mayor cantidad de proteína unida covalentemente produce la mayor discriminación entre el suero positivo y el negativo. Para los dos complejos estudiados, cuando la cantidad de proteína unida es alrededor de 3 mg/m², la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ es máxima (ver Tabla 5.1). A modo práctico, se consideró que la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ debería tener un valor mínimo de 3 para poder discriminar cómodamente entre sueros positivos y negativos.

En cuanto al aumento en la $\Delta A(-)$ con el incremento de la cantidad de proteína unida, éste podría estar relacionado a la pérdida de estabilidad del complejo.

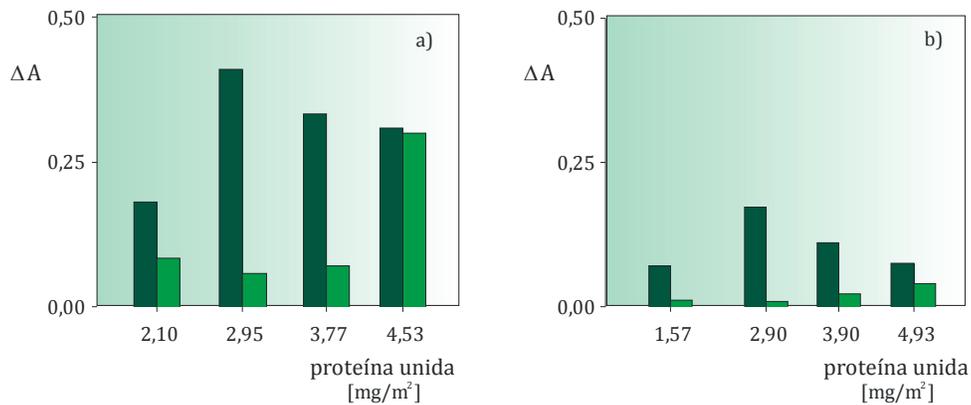


Figura 5.9. Influencia de la concentración de proteína antigénica unida a las partículas sobre el ensayo de IA. a) complejo R2-FRA; b) complejo R2-CP1. La barra verde oscuro representa al suero positivo y la verde claro al suero negativo.

Tabla 5.1 Relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ en función de la cantidad de proteína unida covalentemente para los complejos formados con el látex R2.

R2-FRA ($7,95 \times 10^{-7}$ mEq/cm ²)		R2-CP1 ($7,95 \times 10^{-7}$ mEq/cm ²)	
Proteína unida (mg/m ²)	$\Delta A(+)/\Delta A(-)$	Proteína unida (mg/m ²)	$\Delta A(+)/\Delta A(-)$
2,10	2,19	1,57	5,83
2,95	7,20	2,90	11,25
3,77	4,77	3,90	5,09
4,53	1,03	4,93	1,82

5.2.1.2.c. Efecto del Mecanismo de Sensibilización

Por último, se analizó la influencia del tipo de unión entre las partículas de látex y las proteínas antigénicas en el ensayo de IA. En la Fig. 5.10 se presentan los resultados de los inmunoensayos al enfrentar los sueros controles con distintos complejos látex-proteína obtenidos por adsorción física (AF) o por unión covalente (UC), para cantidades similares de proteína unida.

Con excepción de la proteína recombinante simple Ag36, los complejos obtenidos mediante UC permitieron obtener los mejores resultados, ya que la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ fue mayor. En la AF, la proteína se une a la superficie de la partícula de látex mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno. Estas interacciones son sensibles a los cambios en el medio de reacción (pH y I), que pueden ocasionar la desorción de la proteína unida, y una consecuente pérdida de inmunoreactividad. En el caso del Homogenato del *T. cruzi*, este efecto no fue tan evidente, ya que los complejos R2-Homogenato tienen muy poca cantidad de proteína unida, lo que generó un $\Delta A(+)$ pequeño en comparación con las demás proteínas.

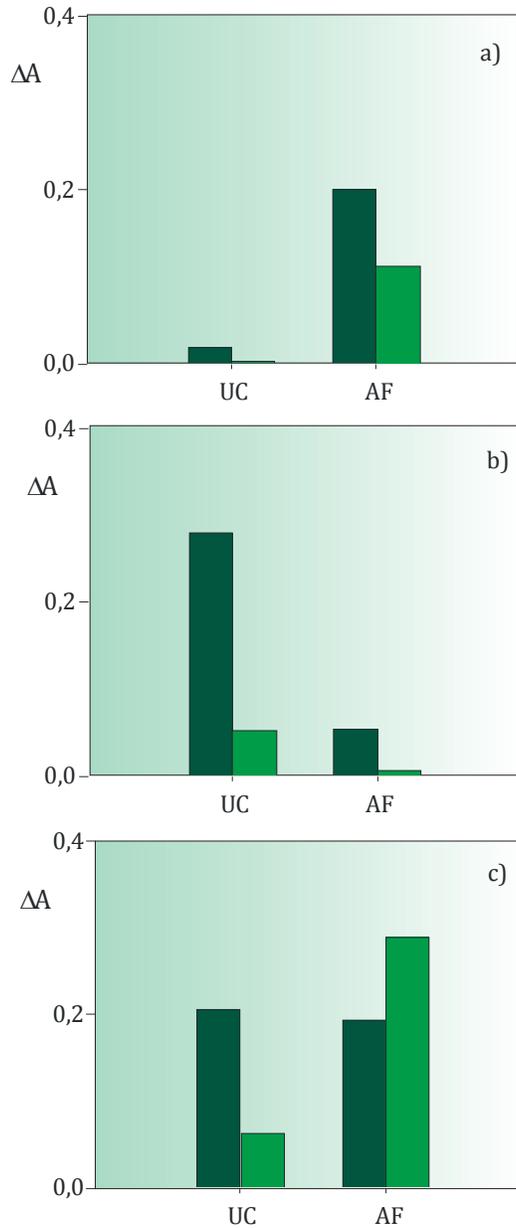


Figura 5.10. Influencia del tipo de unión látex-proteína sobre el ensayo de IA. a) Homogenato del T. cruzi; b) Ag36; c) CP1. La barra verde oscuro representa al suero positivo y la verde claro al suero negativo.

5.2.1.3. Detección de la Reacción de Inmunoaglutinación Mediante el Método Visual

Antes de realizar el ensayo, los complejos látex-proteína se centrifugaron 5 minutos a 10.000 rpm, y se resuspendieron en el buffer utilizado para realizar el inmunoensayo, de manera tal de obtener una concentración final aproximada de 0,50% de

sólidos. Posteriormente, sobre un portaobjeto de fondo negro, se mezclaron 50 μl del complejo látex-proteína y 50 μl del suero control positivo o del suero control negativo, registrándose el tiempo al cual se visualizó el proceso de aglutinación.

En general, la IA se hizo visible a los 35-40 segundos con el suero control positivo; sin embargo, para obtener una diferenciación significativa entre el suero control positivo y el suero control negativo, se observó que el ensayo se debería leer después de 2 minutos, pudiéndose extender incluso hasta 8-10 minutos.

En cuanto a los diferentes complejos látex-proteína, con la proteína recombinante simple FRA se obtuvo mayor velocidad de aglutinación. En cambio, la aglutinación resultó más clara con la proteína recombinante quimérica CP1 expresada en el vector pET24a.

En la Fig. 5.11, se muestran los resultados obtenidos con el complejo R2-CP1 (pET24a) a distintas concentraciones de proteína unida. Tal como se observó por la técnica espectrofotométrica, la mayor discriminación entre el suero positivo y el negativo se produjo para una cantidad de proteína unida de 2,90 mg/m^2 .

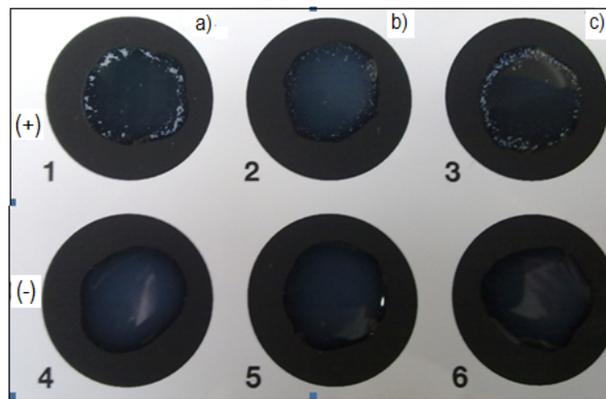


Figura 5.11. Ensayo de IA detectado por el Método Visual a los 4 minutos de poner en contacto al suero control positivo (primera fila) y al suero control negativo (segunda fila); se utilizó el complejo R2-CP1 (pET24a) con distintas concentraciones de proteína unida: a) 2,90 mg/m^2 ; b) 1,57 mg/m^2 ; c) 4,93 mg/m^2 .

5.2.1.4. Evaluación de la Sensibilidad y Especificidad del Ensayo empleando la Turbidimetria como Método de Detección de la Inmunoaglutinación

Se realizaron ensayos de IA empleando distintos complejos (R2-Hom, R2-CP1, R2-FRA y R2-Ag36), y enfrentándolos a un panel de sueros “positivos” y “negativos”. Las muestras de suero fueron obtenidas de una región endémica del noreste Argentino y fueron clasificadas como tal en base a los resultados obtenidos con dos técnicas de diagnóstico de referencia, ELISA y HAI. Para ello, se utilizaron los kit comerciales Chagatest ELISA recombinante V.3 y Chagatest HAI, donados por Wiener Lab. La condición serológica se comprobó cuando se obtuvieron resultados concordantes al realizar las dos pruebas convencionales, según lo establecido por el procedimiento de rigor técnico reconocido por la OMS.

Los ΔA obtenidos a 570 nm con cada complejo látex-proteína fueron empleados para la construcción de la curva ROC, utilizando el software gráfico MedCald. A partir de los valores de corte (cut-off) obtenidos, se representaron las distribuciones de ΔA relativas ($\Delta A/\text{cut-off}$), utilizando el software gráfico GraphPad Prism versión 2.00.

5.2.1.4.a. Evaluación de los Complejos Obtenidos con el Homogenato del *T. cruzi* y con las Proteínas Recombinantes Simples

Se evaluó el rendimiento antigénico cuando los Ags fueron utilizados en forma individual, ya sea como una mezcla de proteínas (Homogenato del *T. cruzi*) o como proteínas recombinantes simples. Para ello, los distintos complejos látex-proteína fueron enfrentados a un panel de 15 sueros positivos y 15 sueros negativos. Los resultados se muestran en las Figs. 5.12 y 5.13.

El Homogenato del parásito, provee una sensibilidad apropiada para detectar Ac en muy bajos niveles (Guhl *et al.*, 2002). Sin embargo, presenta problemas de especificidad y dificultades para estandarizar el método (Salles *et al.*, 1996, Saez-Alquezar

et al., 2000, da Silveira *et al.*, 2001). En la Fig. 5.13, se puede observar que la distribución de la ΔA relativa obtenida para sueros positivos y negativos es muy similar cuando se emplean partículas sensibilizadas con las proteínas del Homogenato de *T. cruzi*, lo que refleja una muy baja especificidad de este complejo para ser utilizado en ensayos de inmunoaglutinación.

Para las proteínas recombinantes, en cambio, existe consenso sobre su buen desempeño en ensayos de ELISA en lo que a sensibilidad y especificidad se refiere (Ibañez *et al.*, 1988; Alemida *et al.*, 1990; Carvalho *et al.*, 1993; Umezawa *et al.*, 1999; Saez-Alquezar *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2001). En nuestro caso, los ensayos de IA realizados con el complejo R2-FRA presentaron mayor sensibilidad (menor cantidad de falsos negativos) y menor valor medio de los sueros negativos que los complejos R2-Ag36, demostrando que la proteína FRA presenta una capacidad altamente antigénica en el estadio crónico de la enfermedad.

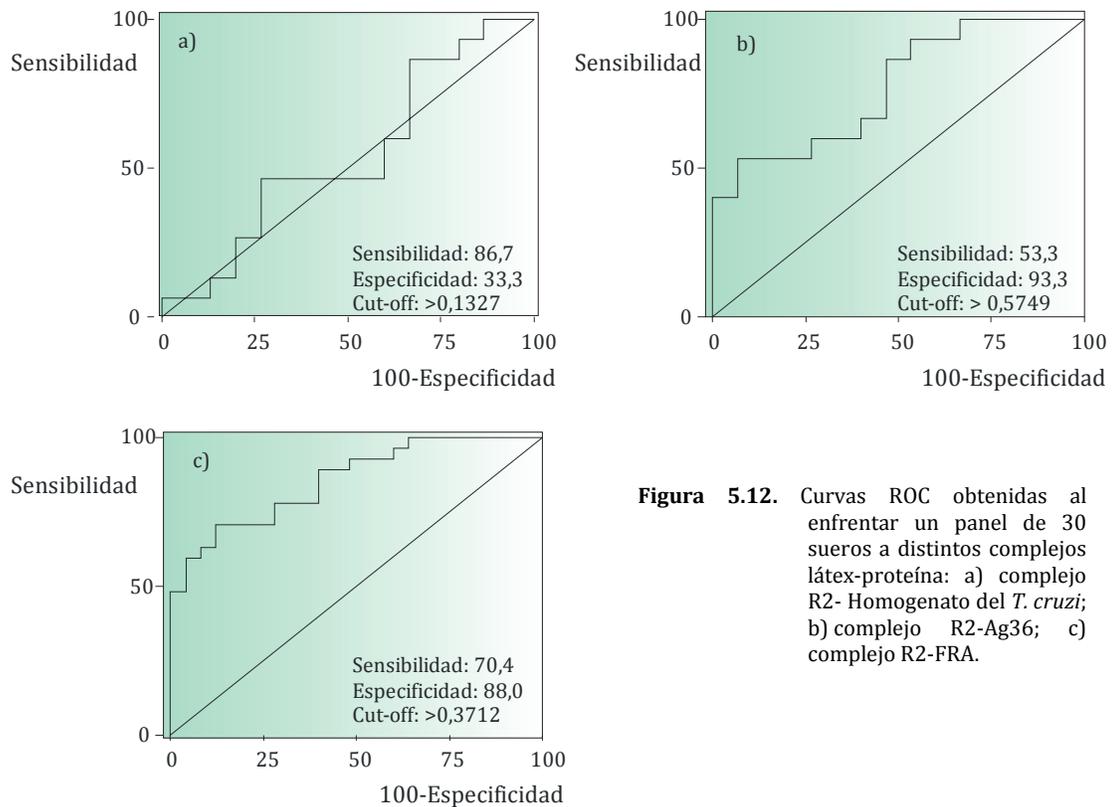


Figura 5.12. Curvas ROC obtenidas al enfrentar un panel de 30 sueros a distintos complejos látex-proteína: a) complejo R2- Homogenato del *T. cruzi*; b) complejo R2-Ag36; c) complejo R2-FRA.

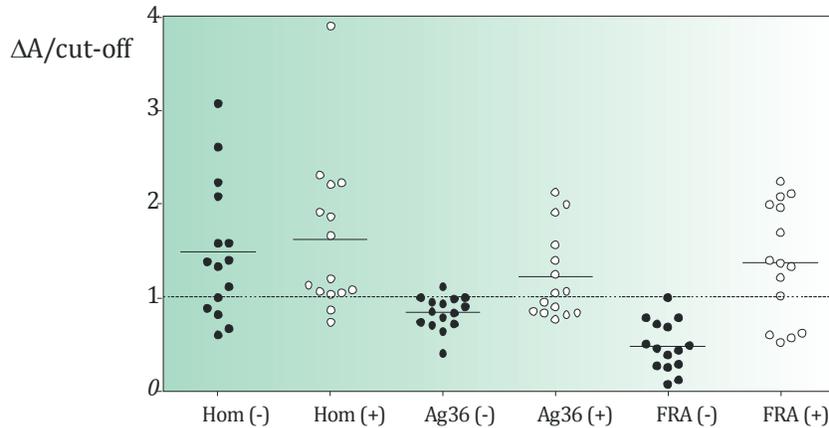


Figura 5.13. Distribuciones de ΔA relativas para un panel de 15 sueros positivos y 15 sueros negativos obtenidas utilizando los complejos R2-Homogentao del *T. cruzi*, R2-Ag36 y R2-FRA. Los segmentos horizontales continuos muestran los valores medios en cada ensayo, mientras que la línea horizontal punteada indica el valor de corte para discriminar entre sueros positivos y sueros negativos.

5.2.1.4.b. Evaluación de los Complejos Obtenidos con una Proteína Recombinante Simple y con una Proteína Recombinante Quimérica Expresadas en el Mismo Vector

Si bien el complejo R2-FRA permitió obtener buenos resultados en los ensayos de IA, el número de falsos negativos resultó elevado. Es por ello que se evaluó el empleo de péptidos antigénicos combinados en una única construcción quimérica. En este caso, se trabajó con la proteína quimérica CP1 (FRA+SAPA), y sus resultados se compararon con los obtenidos con el péptido antigénico simple FRA.

En la Fig. 5.14 se comparan las curvas ROC obtenidas con los complejos R2-FRA y R2-CP1. Se observa que, cuando la proteína utilizada fue CP1, la especificidad se mantuvo constante y la sensibilidad aumentó, disminuyendo de este modo la cantidad de resultados falsos negativos. La ventaja adicional de utilizar la proteína quimérica CP1 es que permite diagnosticar la Enfermedad de Chagas en la etapa aguda y crónica, debido a los Ag que la forman (SAPA y FRA).

La distribución de la ΔA relativa (Fig. 5.15) muestra que al utilizar los complejos formados con la proteína CP1, muchos de los resultados que aparecían como

falsos negativos con los complejos formados con FRA, desaparecen. Esto puede estar relacionado al hecho de que al aumentar el número de determinantes antigénicos presentes en la proteína, aumenta la posibilidad de que éstos sean reconocidos por los Ac presentes en el suero, lo que se refleja en una mayor sensibilidad del ensayo.

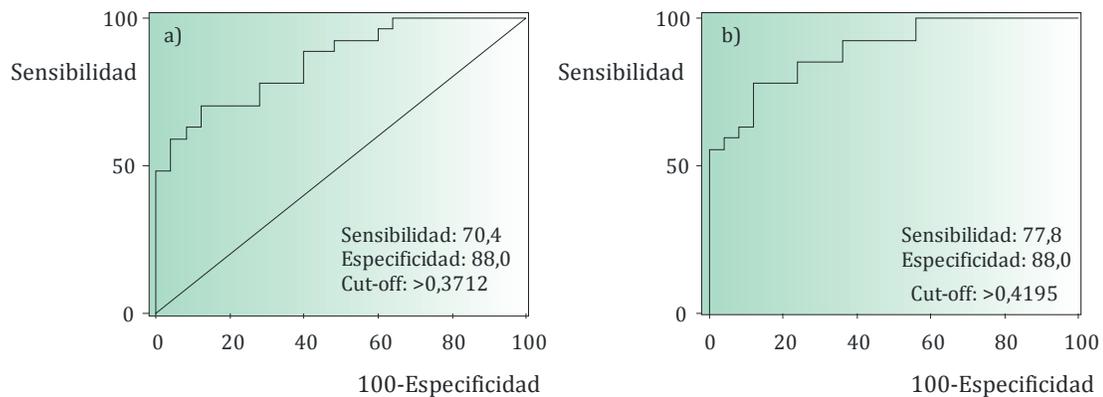


Figura 5.14. Curvas ROC obtenidas al enfrentar un panel de 50 sueros a distintos complejos látex-proteína: a) R2-FRA (pET32a); b) R2-CP1 (pET32a).

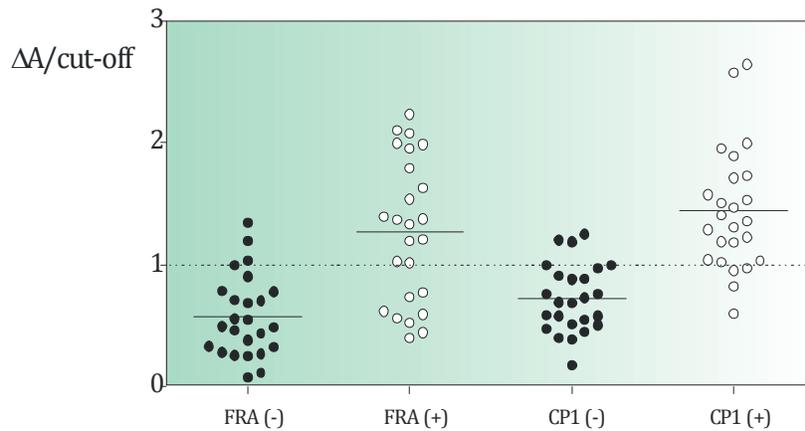


Figura 5.15. Distribución de ΔA relativas para un panel de 25 sueros positivos y 25 sueros negativos utilizando los complejos R2-FRA y R2-CP1, ambos expresados en el vector pET32a. Los segmentos horizontales continuos muestran los valores medios en cada ensayo, mientras que la línea horizontal punteada indica el valor de corte para discriminar entre positivos y negativos.

5.2.1.4.c. Evaluación de los Complejos Obtenidos con Proteínas Recombinantes Quiméricas Expresadas en Distintos Vectores

Finalmente, se analizó si el vector de expresión influye en los resultados obtenidos en los ensayos de IA. Se trabajó con la proteína quimérica CP1 en el vector

pET32a (que expresa la proteína recombinante CP1 con una proteína de fusión, TRX) y en el vector pET24a.

Las curvas ROC resultantes de los complejos R2-CP1 (pET24a) y R2-CP1 (pET32a) se muestran en la Fig. 5.16. Se observó que cuando CP1 fue expresada en el vector pET24a, la especificidad fue menor que cuando se la expresó en el vector pET32a, lo que implica un número mayor de resultados falsos positivos. Sin embargo, la sensibilidad fue considerablemente mayor. Esto se debe al hecho de que existe una relación estrecha entre sensibilidad y especificidad. Sólo muy pocas pruebas son capaces de brindar al mismo tiempo altos valores de ambas variables; y lo habitual es que la sensibilidad y la especificidad se modifiquen en relación inversa.

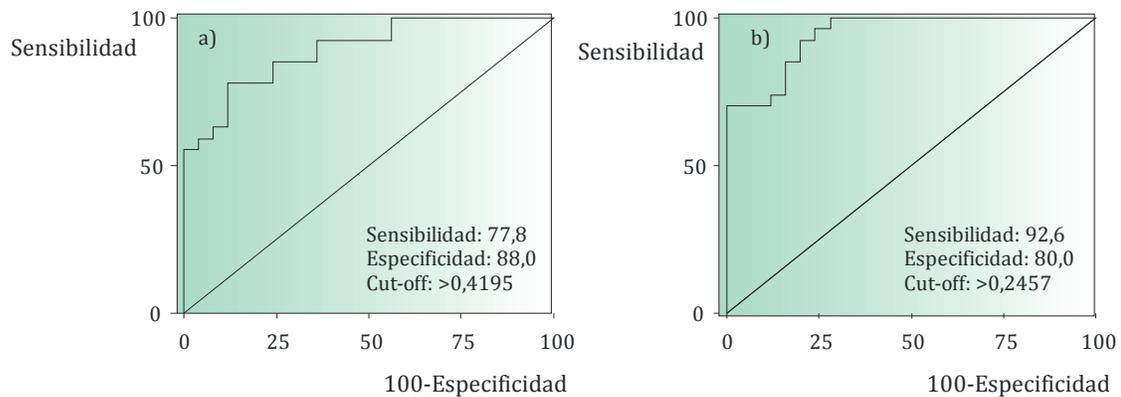


Figura 5.16. Curvas ROC obtenidas al enfrentar un panel de 50 sueros a distintos complejos látex-proteína: a) R2-CP1 (pET32a); b) R2-CP1 (pET24a).

Aunque se ha demostrado que las proteínas expresadas en el vector pET-32a no muestran reacciones inespecíficas con la proteína de fusión TRX (Marcipar *et al.*, 2004), esta última aumenta la señal de fondo o “background” de los sueros negativos, lo que queda reflejado en un valor de corte o “cut-off” mayor al obtenido con la proteína expresada en el vector pET24a (Fig. 5.16).

En cuanto a la distribución de ΔA relativa representada en la Fig. 5.17, se

observa que los resultados falsos negativos obtenidos con los complejos R2-CP1 (pET32a) no aparecen cuando los mismos sueros son enfrentados al complejo R2-CP1 (pET24a), lo que queda reflejado en la mayor sensibilidad obtenida con este último complejo. Esto es más evidente cuando la probabilidad de enfermedad depende del nivel de variables fisiológicas y del nivel de corte (cut-off), es decir de aquel punto donde se considera que la prueba cambia de negativa a positiva. Preferir determinadas características de las pruebas tiene que ver con los propósitos que cada uno considere como los más adecuados. Si se pretende “detectar” la enfermedad se utilizarán pruebas de alta sensibilidad; mientras que si lo que se pretende es “confirmar” la enfermedad, entonces usaremos pruebas de alta especificidad y sensibilidad. En general, se considera que la prueba diagnóstica tiene una validez aceptable si su sensibilidad y su especificidad son iguales o superiores a 80% (Pozo Rodríguez *et al.*, 1988 a; Pozo Rodríguez *et al.*, 1988 b; Argimón Pallás *et al.*, 2006).

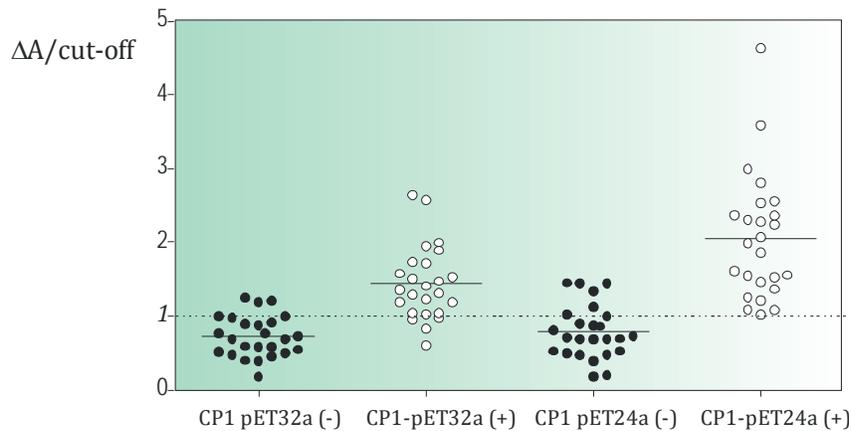


Figura 5.17. Distribución de ΔA relativas para un panel de 25 sueros positivos y 25 sueros negativos, utilizando los complejos R2-CP1 (pET32a) y R2-CP1 (pET24a). Los segmentos horizontales continuos muestran los valores medios en cada ensayo, mientras que la línea horizontal punteada indica el valor de corte para discriminar entre positivos y negativos.

La Tabla 5.2 muestra los valores de cut-off obtenidos con los antígenos estudiados, ya sea solos o como parte de una construcción quimérica, y los valores de eficiencia y límite de discriminación. La eficiencia de discriminación antigénica se calculó mediante la fórmula $\overline{+\Delta A}/\text{cut-off}$, donde $\overline{+\Delta A}$ es el valor de ΔA medio de las muestras

de suero positivas testeadas; mientras que el límite de discriminación se determinó con la fórmula $\overline{+m\Delta A} / \text{cut-off}$, donde $\overline{+m\Delta A}$ es la ΔA mínima, producida por la muestra de suero positiva menos reactiva. A partir de estos parámetros podemos tener una idea aproximada de cuan eficiente es la proteína que forma el complejo látex-proteína para discriminar entre sueros positivos y negativos (eficiencia de discriminación), y cual es el valor límite que permite resumir los resultados de una escala continua en positivo y negativo (límite de discriminación).

Tabla 5.2. Valores de cut-off, y de eficiencia y límite de discriminación para distintos complejos látex-proteína.

	cut-off	Eficiencia de discriminación	Límite de discriminación
R2-Ag36	0,5749	1,2649	0,7895
R2-FRA	0,3712	1,2789	0,4025
R2-CP1 (pET32a)	0,4195	1,4428	0,6010
R2-CP1 (pET24a)	0,2400	2,0537	1,0167

Los mayores valores de eficiencia de discriminación y de límite de discriminación se obtuvieron cuando se trabajó con la proteína CP1. Esto indicaría que la proteína recombinante quimérica presentaría mejor comportamiento como Ag de diagnóstico que las proteínas recombinantes simples, debido a que expresa dos epítopes o determinantes antigénicos que pueden ser reconocidos por los Ac presentes en el suero, tanto en la etapa aguda como en la etapa crónica de la enfermedad.

Además, cuando la proteína CP1 esta expresada en el vector pET24a, los valores de eficiencia y límite de discriminación fueron mayores que cuando se utilizó el vector pET32a. De este modo, se podría suponer que la antigenicidad o particularidad del Ag que hace que éste sea reconocido por un determinado Ac, es mayor cuando se encuentra en el vector pET24a, a pesar de que está demostrado que las proteínas expresadas en pET32a prácticamente no muestran reacción inespecífica con la proteína de fusión TRX presente en el mismo (Marcipar *et al.*, 2004).

En base a lo anteriormente expuesto, se podría concluir que los resultados del test de inmunoaglutinación para detectar la Enfermedad de Chagas utilizando proteínas recombinantes de *Trypanosoma cruzi* están influenciados por el sistema de expresión utilizado para sintetizar la proteína, y que, para un mismo sistema de expresión, la CP1 permite obtener mayor sensibilidad, mayor eficiencia y límite de discriminación que las proteínas recombinantes simples (FRA y Ag36), sin variar la especificidad.

5.2.1.5. Estudio de la Estabilidad de los Complejos Látex-Proteína en el Tiempo

Finalmente se investigó si los resultados de los ensayos de IA, eran reproducibles después de un determinado período de almacenamiento. Para ello, se trabajó con los complejos R2-FRA y R2-CP1 (pET24a), y se estudió su respuesta frente a los sueros control positivo y negativo. Los principales resultados se muestran en la Fig. 5.18 y en la Tabla 5.4.

Durante este análisis se tuvo en cuenta los tres componentes principales que participan del ensayo de IA: los complejos látex-proteína, las moléculas de proteína ancladas a la superficie de las partículas y la calidad del suero utilizado.

Si bien los complejos látex-proteína son estables en el tiempo debido a la naturaleza del látex R2, a menudo, la inmovilización altera significativamente el comportamiento de las proteínas. Generalmente se observa un incremento en la estabilidad, debido a un mayor equilibrio conformacional, y a una disminución de la actividad a lo largo del tiempo, debido a que las condiciones de almacenamiento causan la desnaturalización o desactivación de la proteína, o a efectos difusionales, electrostáticos, estéricos y/o del microentorno. En cuanto a la calidad del suero, los sucesivos procesos de congelamiento (para almacenarlo) y descongelamiento (para utilizarlo), pueden generar una disminución en el título de Ac. Este hecho es muy significativo, si se tiene en cuenta

que, previo a su uso, el suero es sometido a centrifugación para eliminar pequeñas interferencias. Todo esto puede acarrear una disminución de la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ en el tiempo.

La disminución de la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ observada cuando se utiliza el complejo R2-FRA (Fig.5.18 a) está relacionada a una disminución de la variación de absorbancia del suero control positivo [$\Delta A (+)$] en el tiempo, con una modificación poco significativa de la respuesta frente al suero control negativo [$\Delta A (-)$]. Sin embargo, la disminución de la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ cuando se utiliza el complejo R2-CP1 (Fig.5.18 b) se debe principalmente a un aumento de la respuesta frente al suero control negativo ($\Delta A (-)$). Como se observa en la Tabla 5.3, la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ en el caso del complejo R2-CP1 no muestra un cambio significativo después de los 7 meses de almacenamiento; mientras que dicha relación cae a la mitad para el complejo R2-FRA.

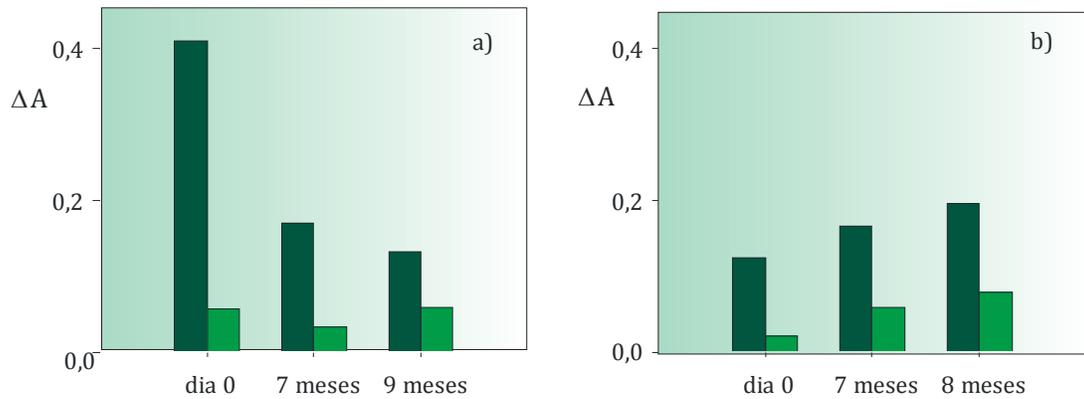


Figura 5.18. Análisis de la reactividad en el tiempo de los complejos látex-proteína al ser enfrentados a los sueros control. a) R2-FRA (pET32a); b) R2-CP1 (pET24a). La barra verde oscuro representa al suero positivo y la verde claro al suero negativo.

Tabla 5.3 Reactividad en el tiempo de los complejos R2-FRA y R2-CP1. Evolución de la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ desde la sensibilización.

R2-FRA		R2-CP1	
Tiempo (meses)	$\Delta A (+)/\Delta A (-)$	Tiempo (meses)	$\Delta A (+)/\Delta A (-)$
0	7,20	0	5,68
7	5,25	7	2,82
9	2,23	8	2,52

5.2.2. Aplicación de los Látex con Funcionalidad Acetal

5.2.2.1. Resultados del Inmunoensayo con Sueros Control en Función de la Cantidad de Proteína Unida y de la Cantidad de Grupos Funcionales Superficiales

Los látex con funcionalidad acetal sensibilizados mediante unión covalente con FRA y CP1 (pET24a), fueron enfrentados a los sueros controles a fin de evaluar la influencia de la cantidad de proteína unida covalentemente y de la cantidad de grupos funcionales superficiales en los ensayos de IA. Los resultados se muestran en la Fig. 5.19.

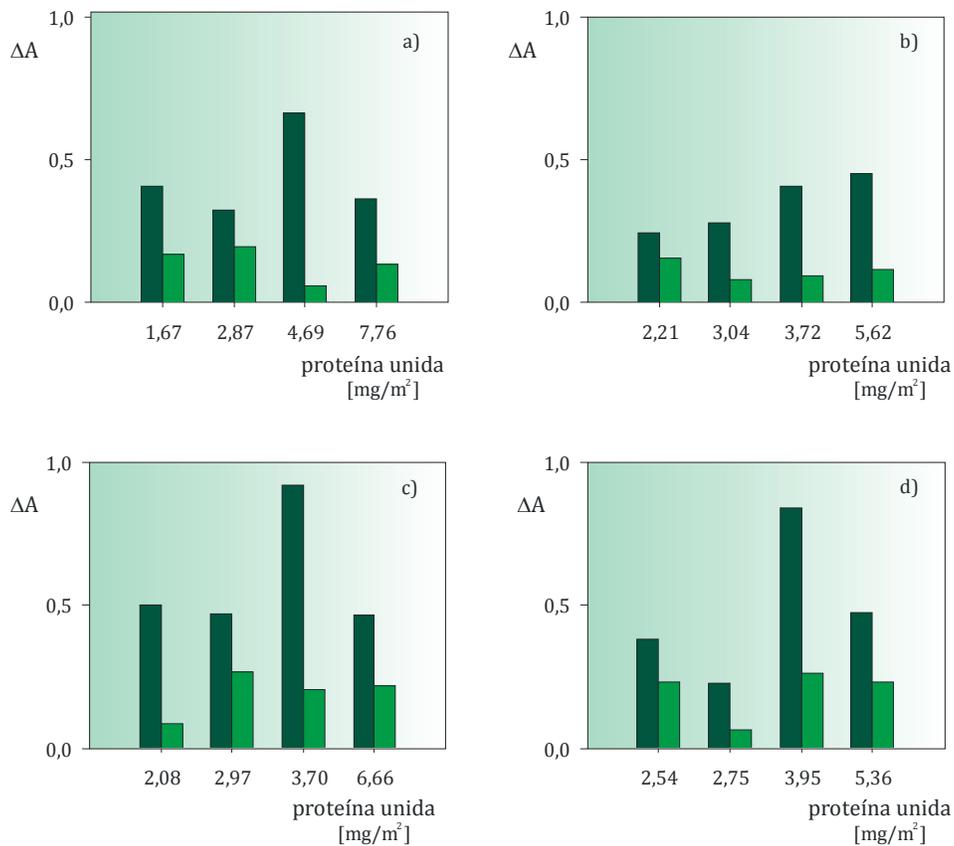


Figura 5.19. Influencia de la concentración de proteína antigénica unida sobre el ensayo de IA utilizando los sueros controles. a) A1-FRA; b) A2-FRA; c) A1-CP1; d) A2-CP1. La barra verde oscuro representa al suero positivo y la verde claro al suero negativo.

A diferencia de lo que ocurre con los látex con funcionalidad carboxilo (Fig. 5.9), en el caso de los látex con funcionalidad acetal la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ no muestra ninguna tendencia al aumentar la cantidad de proteína unida covalentemente. Sin

embargo, aquí también parecería haber un rango de concentración de antígeno unido a la superficie de la partícula, dentro del cual dicha relación es mayor a 3, lo que permitiría discriminar cómodamente entre el suero control positivo y el suero control negativo, según el criterio previamente adoptado (Tablas 5.4 y 5.5).

Tabla 5.4 Relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ en función de la cantidad de proteína unida covalentemente para los complejos formados con el látex A1 ($3,21 \times 10^{-8}$ mEq/cm²).

A1-FRA		A1-CP1	
Proteína unida (mg/m ²)	$\Delta A(+)/\Delta A(-)$	Proteína unida (mg/m ²)	$\Delta A(+)/\Delta A(-)$
1,67	2,38	2,08	5,75
2,87	1,67	2,97	1,76
4,69	11,12	3,70	4,45
7,76	2,71	6,66	2,12

Tabla 5.5 Relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ en función de la cantidad de proteína unida covalentemente para los complejos formados con el látex A2 ($6,28 \times 10^{-8}$ mEq/cm²).

A2-FRA		A2-CP1	
Proteína unida (mg/m ²)	$\Delta A(+)/\Delta A(-)$	Proteína unida (mg/m ²)	$\Delta A(+)/\Delta A(-)$
2,21	1,58	2,54	1,65
3,04	3,47	2,75	3,54
3,72	4,28	3,95	3,22
5,62	3,85	5,36	2,04

En cuanto a la influencia de la cantidad de grupos funcionales superficiales, los valores de la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ no mostraron una diferencia significativa cuando se trabajó indicando que, al menos para los complejos estudiados, una mayor cantidad de grupos funcionales superficiales no siempre garantiza un mejor comportamiento de los complejos látex-proteína. La capacidad de los látex funcionalizados para unir covalentemente proteínas esta relacionada a la cantidad de grupos funcionales superficiales y a la distribución específica de los mismos sobre la superficie de la partícula. Los grupos funcionales presentes en el látex A1, parecen ser suficientes para la inmovilización de las proteínas antigénicas sobre su superficie. En cambio, en el látex A2, que tiene mayor densidad de grupos funcionales superficiales, podría suceder que los

mismos se encuentren muy cerca unos de otros, lo que provocaría que no estén todos disponibles para reaccionar con los Ag durante el proceso de sensibilización (podrían quedar grupos sin reaccionar que queden ocluidos o también podría suceder que una molécula de proteína reaccione con más de un grupo funcional), reduciendo la cantidad de proteína unida a la superficie. Este efecto es más notorio al aumentar el tamaño de la proteína.

5.2.2.3. Estudio de la Estabilidad en el Tiempo

Se analizó la reactividad de los complejos látex-proteína a lo largo del tiempo, y se comparó además, la conservación de los complejos látex-proteína con y sin tratamiento con agente reductor durante el proceso de sensibilización. El agente reductor utilizado fue el BH_4Na ; el mismo actúa sobre los dobles enlaces inestables, que se generan al reaccionar el grupo aldehído de la superficie de las partículas con las proteínas. Este tratamiento evita que los dobles enlaces se hidrolicen y que se produzca la separación de la proteína de la superficie del látex.

Cuando se trabajó con el complejo A1-FRA, se observó que el valor de la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ disminuyó a lo largo del tiempo debido a un aumento en la respuesta frente al suero control negativo (Fig. 5.20 a); mientras que para el complejo A1-CP1, la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ disminuyó principalmente debido a una disminución en la respuesta frente al suero control positivo (Fig. 5.20 c).

Además, los complejos sometidos a la acción del agente reductor no mostraron ninguna tendencia a lo largo del tiempo (Figs. 5.20 b y d), no mejoraron la respuesta de los ensayos de IA (bajos valores de la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$), ni aumentaron la estabilidad en el tiempo. Esto podría estar relacionado a: i) cambios irreversibles en la configuración de la proteína durante el proceso de reducción, que produzcan la

inactivación y/o bloqueo del determinante antigénico; y/o ii) que durante el proceso de sensibilización poca proteína se haya ligado covalentemente a la superficie de la partícula, y por lo tanto no se generen cambios significativos durante el inmunoensayo por encontrarnos en la zona de exceso de Ac. Se debe recordar que la cuantificación de proteína unida covalentemente no fue posible, debido a que el BH_4Na causa interferencias en el método de cuantificación utilizado (BCA) y a que las proteínas estudiadas no absorben a 280 nm.

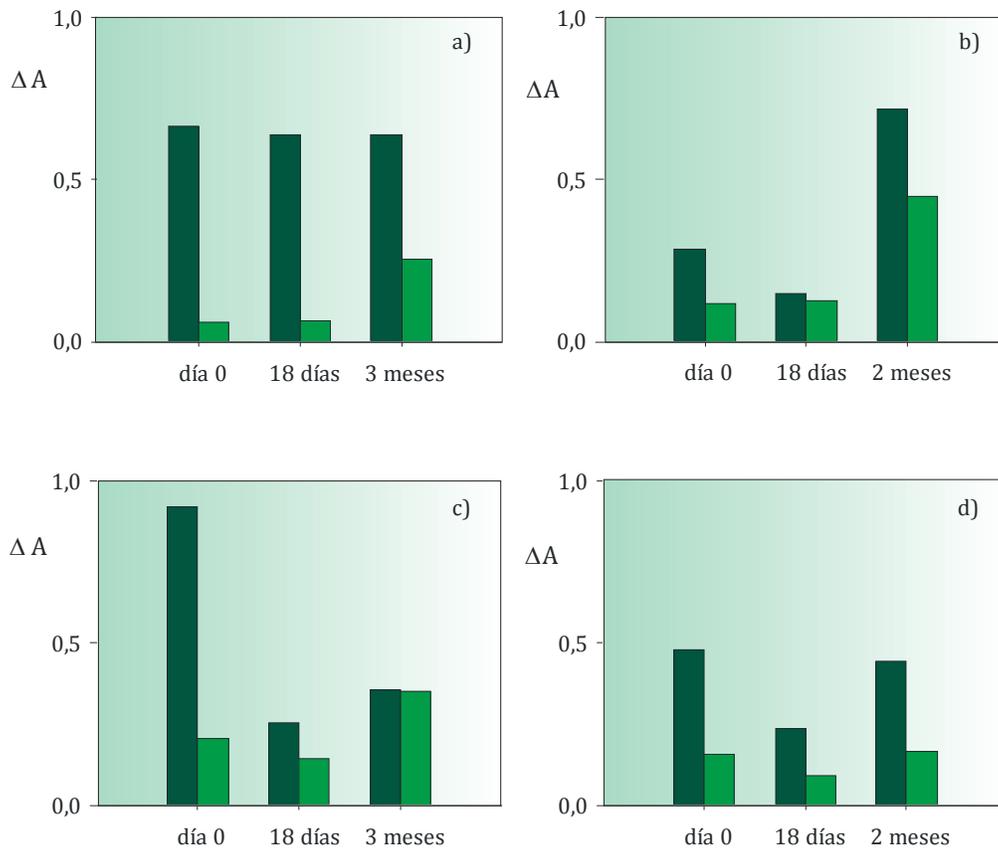


Figura 5.20. Reactividad en el tiempo de los complejos látex-proteína tratados y sin tratar con BH_4Na . a) A1-FRA; b) A1-FRA con BH_4Na ; c) A1-CP1; d) A1-CP1 con BH_4Na . La barra verde oscuro representa al suero positivo y la verde claro al suero negativo.

En la Tabla 5.6 se muestran los valores de la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ en función del tiempo transcurrido entre la sensibilización (formación del complejo látex-proteína) y la realización del inmunoensayo. A modo comparativo, también se incluyen los resultados

obtenidos con los látex con funcionalidad carboxilo (R2-FRA y R2-CP1). Nótese que, con excepción del complejo A1-FRA sin tratar con BH_4Na , los valores de la relación $\Delta\text{A}(+)/\Delta\text{A}(-)$ obtenidos utilizando los látex con funcionalidad carboxilo son mayores a los obtenidos con los látex con funcionalidad acetal; aún cuando el tiempo transcurrido desde la sensibilización es mayor. Los látex con funcionalidad acetal serían menos eficientes para discriminar entre sueros positivos y negativos a causa del pequeño valor de la relación $\Delta\text{A}(+)/\Delta\text{A}(-)$; lo que podría ser debido a las características propias del complejo látex-proteína, tales como baja c.c.c, baja estabilidad en el tiempo, baja densidad de carga superficial, y baja cantidad de grupos funcionales superficiales, respecto al látex carboxilado.

Tabla 5.6 Reactividad en el tiempo de los complejos con funcionalidad acetal. Evolución de la relación $\Delta\text{A}(+)/\Delta\text{A}(-)$ desde la sensibilización.

A1-FRA sin BH_4Na		A1-FRA con BH_4Na		R2-FRA	
Tiempo (días)	$\Delta\text{A}(+)/\Delta\text{A}(-)$	Tiempo (días)	$\Delta\text{A}(+)/\Delta\text{A}(-)$	Tiempo (días)	$\Delta\text{A}(+)/\Delta\text{A}(-)$
0	11,12	0	2,44	0	7,20
18	9,94	18	1,16	210	5,25
90	2,52	60	1,60	270	2,23
A1-CP1 sin BH_4Na		A1-CP1 con BH_4Na		R2-CP1	
Tiempo (días)	$\Delta\text{A}(+)/\Delta\text{A}(-)$	Tiempo (días)	$\Delta\text{A}(+)/\Delta\text{A}(-)$	Tiempo (días)	$\Delta\text{A}(+)/\Delta\text{A}(-)$
0	4,45	0	3,03	0	5,68
18	1,78	18	2,63	210	2,82
90	1,02	60	2,65	270	2,52

5.2.2.2. Evaluación de Sensibilidad y Especificidad del Ensayo

Para el análisis de sensibilidad y especificidad, los complejos látex-proteína obtenidos utilizando el látex A1 y las proteínas recombinantes FRA y CP1 se enfrentaron a un panel de sueros positivos y negativos.

En las curvas ROC mostradas en la Fig. 5.21 queda reflejado que con ambas proteínas la especificidad obtenida fue la misma (80%), pero la sensibilidad fue mayor con el complejo A1-CP1; ésto nuevamente estaría indicando la mejor respuesta como Ag de la

proteína recombinante quimérica. Las distribuciones de las ΔA relativas (Fig. 5.22) obtenidas al enfrentar los complejos látex-proteína con los sueros positivos y negativos fueron muy similares, y no permitieron su discriminación. Esto podría estar relacionado a la estabilidad de los complejos látex-proteína obtenidos a partir del látex con funcionalidad acetal. La c.c.c de estos complejos es muy baja, y podría ocurrir que los complejos aglutinen al entrar en contacto con los sueros, independientemente de la presencia de Ac.

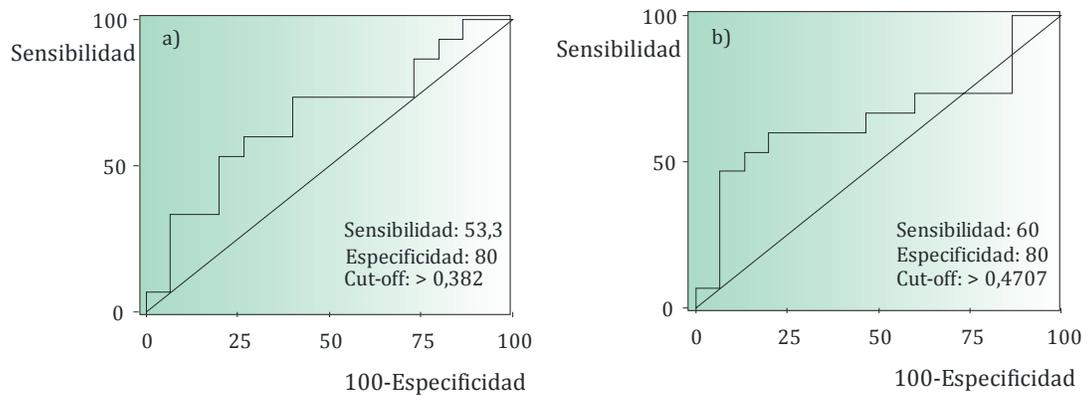


Figura 5.21. Curvas ROC obtenidas al enfrentar un panel de 30 sueros a distintos complejos látex-proteína: a) A1-FRA; b) A1-CP1.

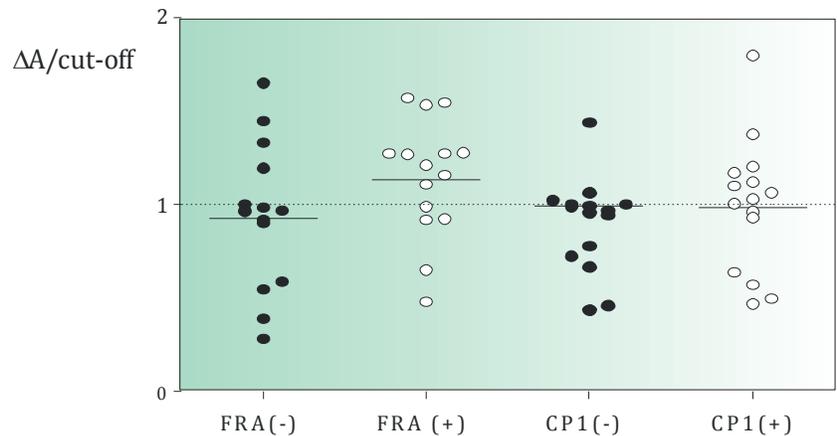


Figura 5.22. Distribución de ΔA relativas para un panel de 15 sueros positivos y negativos, utilizando los complejos A1-CP1 y A1-FRA. Los segmentos horizontales continuos muestran los valores medios en cada ensayo, mientras que la línea horizontal punteada indica el valor de corte para discriminar entre positivos y negativos.

En la Fig. 5.23 se comparan los resultados de la distribución de las ΔA relativas producidas al enfrentar el mismo panel de sueros a los complejos R2-CP1 y A1-CP1. Se observa que, empleando la misma proteína, el complejo obtenido a partir del látex carboxilado permite discriminar mejor los sueros positivos y negativos, y que el ensayo muestra mayor sensibilidad y especificidad.

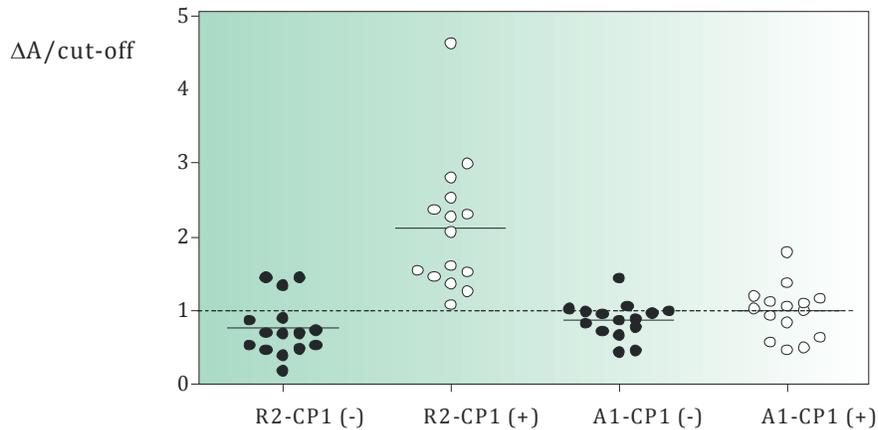


Figura 5.23. Distribución de ΔA relativa para un panel de 15 sueros positivos y negativos, utilizando los complejos R2-CP1 y A1-CP1. Los segmentos horizontales continuos muestran los valores medios en cada ensayo, mientras que la línea horizontal punteada indica el valor de corte para discriminar entre positivos y negativos.

5.4. Conclusiones

En este Capítulo se ha estudiado la utilidad de los complejos sintetizados a partir de látex tipo “core-shell” con funcionalidad carboxilo o acetal, para ser aplicados en test de inmunoaglutinación. Durante el estudio realizado con los sueros controles se observó que:

- La mayor discriminación entre sueros positivos y negativos se obtuvo trabajando a baja fuerza iónica, con el suero sin diluir (mayor concentración de Ac), en presencia de Glicina y PEG en el buffer de reacción, y con una concentración de partículas equivalente a 1 unidad de absorbancia.

- No siempre una mayor cantidad de proteína unida covalentemente produjo la mayor discriminación entre el suero positivo y el negativo, sino que, al menos para los complejos estudiados, se observó que hay un rango de cantidad de proteína unida que produce la máxima relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$.

- Los complejos obtenidos mediante unión covalente de las proteínas permitieron obtener los mejores resultados; esto podría deberse a que la adsorción física es sensible a los cambios en el medio de reacción (pH y I), que pueden ocasionar la desorción de la proteína unida, y una consecuente pérdida de inmunoreactividad. En el caso del Homogenato del *T. cruzi*, este efecto no fue tan evidente, ya que los complejos R2-Homogenato tuvieron muy poca cantidad de proteína unida.

- Durante el análisis mediante el método visual, la inmunoaglutinación se hizo visible a los 35-40 segundos con el suero control positivo, y se observó una discriminación significativa entre el suero positivo y el negativo después de 2 minutos; este tiempo podría extenderse incluso hasta los 8-10 minutos.

- Con la proteína recombinante simple FRA se obtuvo mayor velocidad de aglutinación, mediante el método visual. Sin embargo, la aglutinación resultó más clara con la proteína recombinante quimérica CP1 expresada en el vector pET24a.

Una vez establecidas las condiciones que permitieron la mayor diferenciación entre sueros positivos y negativos, se evaluó el rendimiento antigénico de las distintas proteínas utilizadas unidas covalentemente al látex R2, observándose que:

- Las distribuciones de ΔA relativas obtenidas para sueros positivos y para sueros negativos, resultaron muy similares cuando se emplearon partículas sensibilizadas con las proteínas del Homogenato del *T. cruzi*, lo que refleja una muy baja especificidad de este complejo para ser utilizado en ensayos de inmunoaglutinación.

- Para las proteínas recombinantes, las distribuciones de ΔA relativas mostraron que al utilizar los complejos formados con la proteína recombinante quimérica CP1, muchos de los resultados que aparecían como falsos negativos con las proteínas recombinantes simples desaparecieron, mostrando un aumento de la sensibilidad del ensayo. Esto puede estar relacionado a que, al aumentar el número de determinantes antigénicos presentes en la proteína, aumenta la posibilidad de que éstos sean reconocidos por los Ac presentes en el suero.

- Cuando la proteína CP1 fue expresada en el vector pET24a, la especificidad fue menor, pero la sensibilidad fue considerablemente mayor.

- Los mayores valores de eficiencia de discriminación y de límite de discriminación, se obtuvieron cuando se trabajó con CP1, lo que estaría indicando que la proteína recombinante quimérica presentaría mejor comportamiento antigénico, tanto en la etapa aguda como en la etapa crónica de la enfermedad.

Finalmente, se analizaron los complejos obtenidos con los látex con funcionalidad acetal y se comparó su respuesta durante los inmunoensayos, con la obtenida al utilizar los látex con funcionalidad carboxilo. Se observó lo siguiente:

- A diferencia de lo que ocurre con los látex con funcionalidad carboxilo, en los látex con funcionalidad acetal la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ no muestra ninguna tendencia al aumentar la cantidad de proteína unida covalentemente.

- Para los complejos estudiados, una mayor cantidad de grupos funcionales superficiales no siempre garantizó un mejor comportamiento de los complejos látex-proteína. En el látex A2 (con mayor densidad de grupos acetal), podría suceder que la cercanía entre los grupos provocaría que no estén todos disponibles para reaccionar con

los antígenos durante el proceso de sensibilización, reduciendo la cantidad de proteína unida a la superficie.

- Los látex con funcionalidad acetal son menos eficientes para discriminar entre sueros positivos y negativos, a causa del pequeño valor de la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ que producen, probablemente debido a la baja c.c.c., baja estabilidad en el tiempo, baja densidad de carga superficial, y baja cantidad de grupos funcionales superficiales que presentan, respecto de los látex carboxilados.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

6.1. INTRODUCCION

Los látex poliméricos son objeto de un interés creciente por sus aplicaciones en el campo de la biomedicina como soportes de biomoléculas (proteínas, enzimas, etc.), debido a la versatilidad de las polimerizaciones en medio disperso para producir partículas de látex con distribución de tamaño de partícula, tipo y densidad de grupos superficiales controlados. En este campo, se incluyen los látex para inmunoensayos, y en particular, los utilizados en los “test de aglutinación” que permiten detectar pequeñas concentraciones de Ag o Ac en distintos líquidos biológicos.

El objetivo del presente trabajo de Tesis Doctoral fue diseñar complejos látex-proteína que puedan ser aplicados en el desarrollo de inmunoensayos para detectar la Enfermedad de Chagas. Para ello se consideraron cuatro etapas. La primera de ellas, incluyó la síntesis de partículas de látex funcionalizadas que permitan la interacción química con el Ag utilizado como elemento de reconocimiento durante el inmunoensayo. La segunda etapa, implicó la expresión y purificación de distintos antígenos recombinantes específicos del *T. cruzi*. La tercera, se refirió a la interacción entre el antígeno y la superficie, es decir a la sensibilización de las partículas. La cuarta y última etapa consistió en la aplicación de los distintos complejos látex-proteína frente a un panel

de sueros para analizar su reactividad diagnóstica.

A continuación, se resaltan los resultados más importantes obtenidos, y se sugieren posibles futuras tareas de investigación.

6.1.1. Obtención de los Látex Funcionalizados

Se realizó la síntesis de látex con funcionalidad carboxilo mediante un proceso de copolimerización en emulsión “semibatch” de St y AMA sobre una siembra de PS sintetizada previamente. El agregado de iniciador y del comonomero ácido en la última etapa de la polimerización permitió aumentar la concentración de radicales libres en la fase acuosa y la incorporación de AMA en el copolímero hacia el final de la reacción, lo que permite producir látex de tipo núcleo-coraza con mayor conversión y densidad de carga superficial, que los obtenidos por vía “batch” convencional.

Además, se realizó la síntesis de látex con funcionalidad acetal mediante un proceso de copolimerización en emulsión “batch” de St y ADEA sobre una siembra de PS previamente sintetizada, obteniéndose dos látex de similar tamaño y con distinta densidad de carga superficial

En el futuro, se sugiere avanzar en el estudio de políticas de operación alternativas de polimerización, para obtener partículas de látex monodispersas con valores predeterminados del diámetro medio mayores (1000 nm) y menores (200 nm) a los obtenidos y con distintos valores de densidad de grupos funcionales superficiales. Además, se sugiere avanzar en las políticas de operación de los reactores de polimerización para encontrar las condiciones que permitan maximizar, para una dada receta de monómero de funcionalización, la conversión, la densidad de grupos funcionales, y la estabilidad de las partículas.

6.1.2. Caracterización de las Partículas Coloidales

Luego de su limpieza, los látex sintetizados se caracterizaron superficialmente y se determinó el tamaño medio. La caracterización superficial consistió en determinar la naturaleza y densidad de grupos funcionales superficiales y la estabilidad coloidal de las partículas. La densidad de grupos superficiales se determinó por valoración conductimétrica y fue mayor para el látex carboxilado que para los látex con funcionalidad acetal. La estabilidad coloidal se determinó a través de la *c.c.c.*, que para los látex carboxilados mostró una dependencia con el pH. En general, la estabilidad aumenta con la densidad de carga superficial. Se observó que el látex carboxilado mostró mayor estabilidad coloidal que los látex con funcionalidad acetal.

En la caracterización de tamaños de partícula, se utilizaron las técnicas de SEM, DLS y T para estimar el tamaño medio de las partículas, obteniéndose resultados concordantes. Además, las micrografías de SEM mostraron una distribución de tamaño de partícula muy angosta.

6.1.3. Expresión y Purificación de las Proteínas Antigénicas del *Trypanosoma Cruzi*

Se trabajó con un homogenato del parásito, como así también con proteínas recombinantes simples y quiméricas. Para la obtención de las proteínas recombinantes, se utilizaron células de *Escherichia coli* transformadas por la técnica clásica (shock térmico), con un vector de expresión ligado a las secuencias de ADN de interés. Se indujo la expresión de las proteínas mediante el agregado de IPTG a un cultivo de las células transformadas, y se realizó su purificación en una columna de pseudoafinidad a níquel, obteniéndose proteínas antigénicas exclusivas del *T. cruzi* con un alto grado de pureza y con una adecuada concentración, para su uso en la etapa de sensibilización de las partículas de látex.

Se sugiere, en un futuro, profundizar en la caracterización de las proteínas recombinantes, principalmente en la determinación experimental de su punto isoeléctrico, y en el estudio de su morfología en solución. Se propone utilizar herramientas de biología molecular e informáticas disponibles que permitan elucidar, no sólo posibles estructuras físicamente estables, sino también biológicamente relevantes bajo las distintas condiciones del medio de reacción.

6.1.4. Preparación de los Complejos Látex-Proteína

Se consideró la adsorción física y la unión covalente de las distintas proteínas antigénicas sobre partículas de PS y sobre partículas con grupos funcionales carboxilo o acetal superficiales.

En general, se observó que la máxima adsorción se produjo cerca del pI de las distintas proteínas estudiadas, a través de interacciones hidrofóbicas, debido a que se minimizan las repulsiones electrostáticas intra- e intermoleculares.

Mediante la activación de los grupos carboxilo con el método de la carbodiimida y mediante la transformación de los grupos acetal en aldehído, fue posible la unión covalente de las proteínas a la superficie de las partículas.

Para el Homogenato del *T. cruzi*, la fracción de proteína químicamente unida es relativamente baja y cae ligeramente con el incremento de la C°_{Hom} . Además, no se observó dependencia de la proteína unida covalentemente con el pH, lo que puede deberse a que se trata de una mezcla indefinida de proteínas cuyos pI varían de 5,9 a 6,3.

En el caso de las proteínas recombinantes, se observó que al aumentar la concentración de proteína adicionada, aumenta tanto la proteína total unida como la ligada covalentemente. Sin embargo, la relación entre la proteína unida covalentemente y

la proteína adicionada en general disminuye al aumentar la concentración de proteína adicionada, lo que es debido a la saturación de los grupos carboxilos superficiales. Se observó además, en todos los casos, un incremento de la cantidad de proteína unida cerca del pI teórico de las mismas.

A futuro, se podría profundizar en la caracterización de los complejos látex-proteína, incluyendo el análisis de su comportamiento electrocinético.

6.1.5. Aplicación de los Complejos Látex-Proteína en Ensayos de Inmunoaglutinación

Se estudió la reacción de inmunoaglutinación de los diferentes complejos látex-proteína mediante turbidimetría, enfrentándolos a sueros positivos y negativos.

Cuando se emplean partículas sensibilizadas con las proteínas del Homogenato de *T. cruzi*, las distribuciones de ΔA relativas obtenidas con sueros positivos y con sueros negativos resultaron muy similares lo que refleja una muy baja especificidad de este complejo para ser utilizado en ensayos de inmunoaglutinación.

En el caso de las proteínas recombinantes, se observó que los complejos formados con la proteína recombinante quimérica, permitieron aumentar la sensibilidad del ensayo de inmunoaglutinación. Esta proteína mostró además los mayores valores de eficiencia y de límite de discriminación, lo que estaría indicando que la proteína recombinante quimérica presenta mejor comportamiento como Ag, tanto en la etapa aguda como crónica de la enfermedad.

Los látex con funcionalidad acetal mostraron ser menos eficientes para discriminar entre sueros positivos y sueros negativos a causa del pequeño valor de la relación $\Delta A(+)/\Delta A(-)$ que producen. Esto puede deberse a las características propias de

dichos complejos látex-proteína, tales como baja densidad de carga superficial, baja *c.c.c.*; y baja estabilidad en el tiempo, respecto del látex carboxilado.

Como trabajo a futuro, se podría profundizar en el estudio de la influencia de las variables del inmunoensayo sobre el proceso de aglutinación. En particular, se podría analizar el efecto de: i) el tamaño de las partículas utilizadas en la formación de los complejos; ii) la funcionalidad y densidad de carga superficial de las partículas; iii) la concentración de partículas; y iv) la apariencia y concentración del suero.

ABREVIATURAS

A: Absorbancia

A1 y A2: Látex con Funcionalidad Acetal Obtenidos Mediante Copolimerización "Batch"

aa: Aminoácidos

Ac: Anticuerpo

ADEA: Acroleina Dietil Acetal

ADN: Ácido Desoxiribonucleico

AF: Adsorción Física

Ag: Antígeno

Ag-Ac: Antígeno-Anticuerpo

AMA: Ácido Metacrílico

APS: Persulfato de Amonio

BCA: Ácido Bicinconínico.

BL: Blanco de Látex.

BL1, BL2, BL3 y BL4: Soluciones para la Purificación en Columna de Ni²⁺

BSA: Albúmina de Suero Bovino.

c.c.c.: Concentración Crítica de Coagulación.

CDI: N-N-(3-dimetilaminopropil) N'-etilcarbodiimida.

CI: Complejos Inmunes

CMC: Concentración Micelar Crítica.

CP1: Proteína Quimérica

DDI: Ultrapura Destilada y Deionizada

D_{DLS}: Diámetro Promedio Obtenido por Dispersión de Luz Dinámica

DLS: Dispersión de Luz Dinámica.

DO₅₅₀: Densidad Óptica a 550 nm

D_T: Diámetro Promedio Obtenido por Turbidimetría

DTP: Distribución de Tamaños de Partículas.

ELISA: Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas

FRA: Antígeno Flagelar Repetitivo

HAI: Hemoaglutinación Indirecta

I: Fuerza iónica

IA: Inmunoaglutinación

IDO: Intensidad de Pixel Obtenida

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta

Ig: Inmunoglobulina

IMAC: Cromatografía de Afinidad de Ion Metálico Inmovilizado

IPTG: Isopropil- β -D-Tiogalactopiranosido

kDa: KiloDalton

LB: Caldo Luria-Bertani

MA-80: Sulfosuccinato Dihexil Sodio

MDLS: Dispersión de Luz Dinámica a Múltiples Ángulos.

ME: Microscopía Electrónica.

mM: Milimolar

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

pb: Pares de Bases

PBS: Buffer Fosfato Salino

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDS: Polidispersidad

PEG: Polietilenglicol

pI: Punto Isoeléctrico.

PM: Peso molecular

PS: Poliestireno.

R2: Látex Carboxilados Obtenidos Mediante Copolimerizaciones "*Semibatch*".

ROC: Receiver Operating Charecteristics

S4: Siembra de Poliestireno.

SAPA: Antígeno de Fase Aguda

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio.

SDS-PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en Presencia de SDS

SEM: Microscopía Electrónica de Barrido

St: Estireno.

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*.

T: Turbidimetría.

TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

TMBS: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

UC: Unión Covalente

NOMENCLATURA

c : Concentración másica de polímero.

$C_{\text{Hom, sol}}$: Concentración de Homogenato en solución en el equilibrio

$C_{\text{Ag36, sol}}$: Concentración de Ag36 en solución en el equilibrio

$C_{\text{FRA, sol}}$: Concentración de FRA en solución en el equilibrio

$C_{\text{CP1, sol}}$: Concentración de CP1 en solución en el equilibrio

C°_{Hom} : Concentración de Homogenato inicial.

C°_{Ag36} : Concentración de Ag36 inicial.

C°_{FRA} : Concentración de FRA inicial.

C°_{CP1} : Concentración de CP1 inicial.

C_{KBr} : Concentración de KBr.

D : Diámetro de partícula.

d_T : Coeficiente de difusión traslacional.

$G_{\infty, \theta_r}^{(2)}$: Línea de base de la función de autocorrelación de la intensidad de luz dispersada.

I_{θ}, I : Intensidades de los haces incidente y emergente.

k_B : Constante de Boltzmann.

$m(\lambda_j)$: Relación de índices de refracción de las partículas y del medio.

M_{DLS} : Número total de canales del correlador o puntos de la función de autocorrelación.

M_T : Número de puntos del espectro de turbidez.

n_m : Índice de refracción del medio.

n_p : Índice de refracción de las partículas.

N_p : Densidad numérica o concentración en número de las partículas.

N_s : Número total de muestras.

q : Vector de onda.

Q_{ext} : Eficiencia de extinción de la partícula.

t : Tiempo.

T_0 : Temperatura absoluta.

x : Conversión global.

$x(D, \lambda_j)$: Tamaño relativo de las partículas.

Símbolos Griegos

θ_r : Ángulo de detección.

Γ_{FRA} : Cantidad de FRA unida por unidad de área de partículas.

Γ_{CP1} : Cantidad de CP1 unida por unidad de área de partículas.

Γ_{Hom} : Cantidad de Homogenato unida por unidad de área de partículas.

Γ : Constante de decaimiento característica de las partículas.

ξ_{θ_r} : Intensidad de luz dispersada al ángulo θ_r .

λ_j : Longitud de onda de la luz incidente en el medio.

λ_{DLS} : Longitud de onda en el vacío de la luz láser incidente.

τ_j : Tiempo de decaimiento discreto.

β : constante "instrumental".

σ : Densidad de carga superficial.

δ_{COOH} : Densidad de grupos COOH superficiales.

$\delta_{SO_4^-}$: Densidad de grupos SO_4^- superficiales.

$\delta_{CH(OCH_2CH_3)_2}$: Densidad de grupos $CH(OCH_2CH_3)_2$ superficiales.

ρ : Densidad del polímero.

η : Viscosidad del medio.

$\overline{+m\Delta A}$ /cut-off: Límite de discriminación.

$\overline{+\Delta A}$ /cut-off: Eficiencia de discriminación antigénica.

$\Delta A(-)$: Diferencia de absorbancia del complejo látex-proteína en presencia del suero negativo

respecto a la absorbancia del complejo en ausencia de suero

$\Delta A(+)$: Diferencia de absorbancia del complejo látex-proteína en presencia del suero positivo respecto a la absorbancia del complejo en ausencia de suero

$\Delta A/\text{cut-off}$: Distribución de la ΔA relativa

ΔA : Incremento en la absorbancia óptica

Γ_{FRA} : Cantidad de FRA unido por unidad de área de partículas.

Γ_{CP1} : Cantidad de CP1 unido por unidad de área de partículas.

Γ_{Hom} : Cantidad de Homogenato unido por unidad de área de partículas.

Γ_{Ag36} : Cantidad de Ag36 unida por unidad de área de partículas.

REFERENCIAS

- Aguirre, S., Silver, A., Brito, M., Ribone, M., Lagier, C., Marcipar, I., *J. Clin. Microbiol.* 44:1043 (2006)
- Ahmed, S.M., El-Aasser, M.S., Pauli, G.H., Poehlein, G.W., Vanderhoff, J.W., *J. Colloid Interface Sci.*, 73: 388 (1980).
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., *Molecular Biology of the Cell*, 3^o Ed., (1996).
- Alemida, I.C., Covas, D.T., Soussumi, L.M., Travassos, L.R., *Trasfusion*, 35:850 (1990)
- Amico, S., Liehn, J.C., Desoize, B., Larbre, H., Deltour, G., Valeyre, J., *Clin Nuci Med.*, 16: 643 (1991).
- Andrade, S.G. *Rev. Soc. Brazil Med. Trop.*, 18:39 (1985).
- Andreotti, G. V., Ludwig, A., Harwood Peruski, J. J., Tuite, S. S. Morse, L. F., Peruski, *BioTechniques*, 35, 850 (2003).
- Araque, W., De Lima, A.R., Flores, G., Garboza, R., Arteaga, R., Delgado, V., *Acta Cientif Venezol*; 47:211 (1996).

-
- Argimón Pallás, J.M., Jiménez Vila, J., *Métodos de investigación clínica y epidemiológica*. Ediciones Harcourt, (2006).
- Aznar, C., Bergami, L.P., Bendariz, S., Mariette, C., Liegar, P., Alves, D., Barreiro, L.E., Carrasco, R., Lafon, S., Kaplan, D., Miguez, H., Camacho, C., Lwvin, G., Hontebeyrie, M., *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 12:231 (1995).
- Bagchi, P., Birnbaum, S.M., *J. Colloid Interface Sci.*, 83, 460 (1981).
- Bahadur, A., Bahadur, P., Riess, G., *Makromol. Chem.*, 186, 1387 (1985).
- Basinska, T., Slomkowski, S., *Ed. G. G. Guilbaut y M. Mascini*, Netherlands, (1993).
- Bastos-González, D., Ortega-Vinuesa, J.L., De Las Nieves, F.J., Hidalgo-Álvarez, R.J., *Colloid Interface Sci.*, 176, 232 (1995).
- Bastos-González, D., Santos-Pérez, R., Forcada, J., Hidalgo-Álvarez, R., De Las Nieves, F.J., *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 92:, 137 (1994).
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. and Bourne, P. E. *NUCL ACID RES*, **28**, 235(2000).
- Bettencourt, A.L., *American Journal Disease Children*, 130:97 (1976).
- Bird, G.W.G., Wingham, J., *Techniques in Clinical Immunology*, 43 (1977).
- Bjellqvist, B., Basse, B., Olsen, E., Celis, J.E., *Electrophoresis*, 15:529 (1994).
- Bjellqvist, B., Hughes, G.J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., *Electrophoresis* 14: 1023 (1993).
- Bloisi, R.M., *Principles of Immunology and Immunodiagnostic*. Ed. Lea/Tebiger (1988).
- Bolin, V.S., Sue Chase, B., Alsever, J.B., *Am. J. Clinical Pathology*, 49:635 (1968).
-

-
- Borque, L., Bellod, L., Rus, A., Seco, M.L., Galisteo-González, F., *Clin. Chem.*, 46: 1839 (2000).
- Borque, L., Rus, A., *Beckman Instruments España*, (1996).
- Bucci, G., Anzidei, M., Madaghiele, A., Vendramin, G.G., *Molecular Ecology*, 7:1633 (1998).
- Bucio, M.I., Cabrera, M., Segura, E.L., Zenteno, E., Salazar-Schettino, M., *Immunol Invest*; 28:257(1999).
- Bullock, G.R., Petrusz, P., *Techniques in immuno-cytochemistry*. Vol. 4. Academic Press (1989).
- Burns, C.M., Tsai, V., Zvaifler, N.J., *Arthritis Rheum.*, 35(8):865 (1992).
- Caballero, M., Ruiz, R., Marquez del Prado, M., Seco, M., Borque, L., Escanero, J.F., *J. Clin. Lab. Anal.*, 13:301 (1999).
- Cambiaso, C.L., Galanti, L.C., Leautaud, P., Masson, P.L., *Journal of Clinical Microbiology*, 30(4):882 (1992).
- Camussone, C., Gonzalez, V., Belluzo, M., Pujato, N., Ribone, M., Lagier, C., Marcipar, I., *Clinical and Vaccine Immunology*, 16 (6): 899 (2009)
- Carson, J.L., Eisenberg, J.M., Shaw, L.M., Kundel, H.L., Soper, K.A., *JAMA* 253: 665 (1985).
- Carvalho M.R., Krieger, M.A., Almeida, E., Oelemann W., Shikanai-Yassuda, M.A., Ferreira, A., Pereira, J.B., Seez-Alquezar, A., Dorlhiac-Llacer, P.E., Chamone, D.F., Goldenberg, S., *Trasfusion*, 33: 830-834 (1993)
- Cattand, P., de Raadt, P., *Clin. Lab. Med.*, 11:899 (1991)
- Cerisola, J. A., Alvarez, M., Wynne de Martín, J., *Medicina*, 40 (1): 132 (1980).
- Chagas, C., *Vorläufige Mitteilung. Arch. Schiff. Tropenhyg*, 13:120 (1909).
-

-
- Charleux, B., Fanget, P., Pichot, C., *Makromol. Chem.*, 193: 205 (1992).
- Chen, J., Jin, M., Yu, Z., Dan, H., Zhang, A., Song, Y., Chen, H., *J. Vet. Diagn. Invest.*, 19: 155 (2007).
- Chen, X., Hiller, M., Sancak, Y., Fuller, M.T., *Science*, 310:5749 (2005).
- Cohen, R.J., Benedek, G.B., *Immunochemistry*, 12, 349 (1975).
- Contreras, V.T., Araque, W., Delgado, V., *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 89:253 (1994).
- Contreras, V.T., De Lima, A.R., Zorrilla, G., *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 93:753 (1998).
- Cotrim, G. Paranhos, R. Mortara, J. Wanderley, A. Rassi, M. Camargo, J. F. Da Silveira, *J. Clin. Microbiol.*, 28 (3), 519 (1990).
- Coura, J.R., Fernandes, O., Arboleda, M., Barrett, T.V., Carrara, N., Degrave, W., Campbell, D.A., *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90:278 (1996)
- DaRocha, W., Bartholomeu, D., Macedo, C., Horta, M., Cunha- Neto, E., Donelson, J., Teixeira, S., *Parasitol. Res.* 88:292–300 (2002).
- Da Silveira, E. S. Umezwa, A. Luquetti, *Trends in Parasitol.*, 17(6): 286 (2001).
- Daniels, W.E., Vanderhoff, J.W., Enos, C.T., Iacoviello, J.G., Ahmed, S.M., Frost, J., *Applied Science*, 191(1981).
- De Lima, A.R., Arévalo, P., Bastidas, V., Bolívar, M.L., Navarro, M.C., Contreras, V., *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo*, 11(1) (2007).
- De Wit, R., Hoek, F.J., Bakker, P.J., Veenhof, C.H., *J Intern Med*; 229:463 (1991).
- Delair, Th., Marguet, V., Pichot, C., Mandrand, B., *Colloid Polym. Sci.*, 272, 962-970 (1994b).
-

-
- Delair, Th., Pichot, C., Mandrand, B., *Colloid Polym. Sci.*, 272, 72-81 (1994a).
- Dey, S., Madhan Mohan, C., Ramadass, P., Nachimuthu, K., *Veterinary Research Communications*, 31: 9 (2007).
- Dupont, A., Cusan, L., Gómez, J.L., Thibeault, M.M., Tremblay, M., Labrie, F., *J. Urol*; 146:1.064 (1991).
- El-Aasser, M.S., Ahmed, S.M., Poehlein, G.W., Vanderhoff, J.W., Rovira, X., Tabernero, J.I., de La Morena, P., *Polymer Colloids II*, 361 (1980).
- Eliçabe, G., García-Rubio, L., *Advances in Chemistry Series*, 227: 83, (1990).
- Elwing, H., Nilsson, B., Svensson, K.E., Askendahl, A., Nilsson, U.R., Lundstrom, J., *J. Colloid Interf. Sci.*, 125, 139 (1988).
- Engmen, D.M., Dragon, E.A., Donelson, J.E., *J. Immun.*, 144:3987 (1989)
- Engvall, E., Perlmann, P., *J. Immunol.*, 109:129 (1972).
- Everett, D.H., Gültepe, M.E., Wilkenson, M.C., *J. Colloid Interface Sci.*, 71, 336 (1979).
- Flack, M.R., Oldfield, E.H., Cutler, G.B., Zweig, M.H., Malley, J.D., Chrousos, G.P., *Ann Intern Med.*, 116: 211 (1992).
- Frasch, A.C., Reyes, M.B., *Parasitol. Today*, 6: 137-139 (1990)
- Freilij, H., Altchek, J., *Clin. Infect. Dis.*, 21:551 (1995)
- Gibanel, S., Heroguez, V., Gnanou, Y., Aramendia, E., Bucsi, A., Forcada, J., *J. Polym. Adv. Technol.* 12: 494 (2001).
-

-
- Godsel, L.M, Tibbetts, R.S., Olson, C.L., Chaudoir, B.M., Engman, D.M., *J. Clin. Microbiol.*, 33:2082 (1995).
- Goldenberg, S., Krieger, M.A., Cerqueira De Almeida, E.C., US5736348 (1998).
- Goldenberg, S., Krieger, M.A., Cerqueira De Almeida, E.C., WO1991015584 (1991).
- Gomes, Y.M., Pereira, V.R., Nakazawa, M., Rosa, D.S., Barros, M.D., Ferreira, A.G., Silva, E.D., Ogatta, S.F., Krieger, M.A., Goldenberg, S., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96: 497-501 (2001)
- Gonzalez, V. D. G., Gugliotta, L. M., Meira, G. R., *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 19:777 (2008a)
- Gonzalez, V. D. G., Gugliotta, L. M., Meira, G. R., *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 19:789 (2008b)
- Gonzalez, V. D. G., Gugliotta, L. M., Vega, J. R., Meira, G. R., *Journal of Colloid and Interface Science*, 285(2): 581 (2005).
- Gonzalez, V.D.G., Garcia, V.S., Vega, J.R., Marcipar, I.S., Meira, G.R., Gugliotta, L.M., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77:12 (2010).
- Gonzalez, V.D.G., Gugliotta, L.M., Vega, J.R., Meira, G.R., *Proceedings of Enpromer II*, 847 (2001).
- Gonzalez, V.D.G., Tesis Doctoral, Univ. Nac. del Litoral, Fac. Ing. Qca., 2004.
- Goto, Y., Carter, D., Reed, S., *Infect. Immun.* 76:3967–3974 (2008).
- Greig, N.G., Ries, L.G., Yancik, R., Rapoport, S.I., *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1621 (1990).
- Gruber, A., Zingalles, B., *Exp. Parasitol.*, 76: 1-12 (1993)
-

-
- Gugliotta, L. M., Vega, J. R., Meira, G. R., *Journal of Colloid and Interface Science*, 228:14,(2000).
- Gugliotta, L.M., Arotçarena, M., Leiza, J.R., Asua, J.M., *Polymer*, 36, 2019-2023 (1995b).
- Gugliotta, L.M., Arzamendi, G., Asua, J.M., *J. Appl. Polym. Sci.*, 55, 1017 (1995a).
- Gugliotta, L.M., Clementi, L.A., Vega, J.R., *Measurement of Particle Size Distribution of Polymer Latexes*, ISBN: 978-81-308-0413-2 (2010).
- Gugliotta, L.M., Leiza, J.R., Arotçarena, M., Armitage, P.D., Asua, J.M., *Ind. Eng. Chem. Res.*, 34, 3899 (1995c).
- Gugliotta, L.M., Vega, J.R., Antonione, C.E., Meira, G.R., *Polymer Reaction Engineering*, 7(4), 531-552 (1999).
- Guhl, F., Hudson, L., Marinkelle, C.J., Jaramillo, C.A., Bridge, D., *Parasitology* 94:475 (1987).
- Guhl, F., Jaramillo, C., Carranza, J.C., Vallejo, G.A., *Arch. Med. Res.*, 33: 362-370 (2002)
- Guyatt, G.H., Oxman, A.D., Alí, M., Willan, A., Mcllroy, W., Patterson, C., *J Gen Intern Med*; 7: 145 (1992).
- Hammock, B.D., Mumma, R.O., *American Chemical Society*, (1980).
- Harkins, W.D., *J. Chem. Phys.*, 14, 47 (1946).
- Harlow, E., Land, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (1988).
- Hearn, J., Wilkensen, L.M.C., Goodall, A.R., *Advances in Colloid and Interface Sci.*, 14, 173 (1981).
- Hen, J., *J. Colloid Interface Sci.*, 49, 425 (1974)
-

- Hermann, G.A., Sugiura, H.T., Krumm, R.P., *Arch Pathol Lab Med*;110: 21 (1986).
- Heymer, B., Schachenmayr, W., Bultmann, B., Spanel, A., Haferkamp, O., Schmidt, W., *J. Immunology*, 111:478 (1973).
- Hipp, S., Berns, D.S., Tompkins, V., Buckley, H., *Sebouraudia*, 8:237 (1970).
- Horwitz, C., Jerome, E., Diamond, R., Ward, P., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 116:626 (1973).
- Houghton, R., Benson, D., Reynolds, L., McNeil, P., Sleath, P., Lodes, M., Skeiky, Y., Badaro, R., Krettli, U., Reed, S., *The Journal of Infection disease*, 181:325 (2000).
- Houghton, R.L., Reed, S.G., Raychaudhuri, S., US20080287362 A1 (2008).
- Huang, Y.H.; Li, Z.M.; Morawetz, H. *J. Polym. Sci.*, 23, 795 (1985).
- Hun, Z. Zhang. *Bioelectron.*, 22, 2743-2748 (2007).
- Ibañez, C.F., Affranchino, J.L., Macina, R.A., Reys, M.B., Aslund, U., Petterson, U., Frasch, A.A.C., *Biochem. Parasitol.*, 30: 27-34 (1988)
- Inagaki, T., Arakawa, E.T., Hamm, R.N., Williams, M.W., *Phys. Rev. B.*, 15:3243 (1977).
- Izquierdo Rojo, M., *Ingeniería Genética y Transferencia Génica*, (2001).
- Jiang, J., Chan, Y.S., Loh, Y.H., Cai, J., Tong, G.Q., Lim, C.A., Robson, P., Zhong, S., *Nat Cell Biol* 10: 353 (2008).
- Johnstone, A., Thorpe, R., *Immunochemistry in Practice*. 1st edition. Blackwell Scientific Publications. (1982).
- Jung, Y., Kang, H.J., Lee, J. M., Jung, S. O., Yun, W. S., Chung, S. J., Chung, B. H., *Anal. Biochem.*, 374, 99 (2008).

-
- Kadar, N., DeCherney, A.H., Romero, R., *Fertil Steril*; 37: 542 (1982).
- Kapmeyer, W.H., Pauly, H.E., Tuengler, P., *J. Clin. Lab. Anal.*, 2, 76 (1988).
- Kapmeyer, W.H., *Pure and Appl. Chem.*, 63, 1135 (1991).
- Kawaguchi, H., *Prog. Polym. Sci.*, 25:1171 (2000).
- Kazmierczack, S.C., Catrou, P.G., Van Lente, F., *Clin Chem.*; 39:1.960 (1993).
- Kazmierczack, S.C., Van leute, F., Hodges, E.D., *Clin Chem*; 37: 356 (1991).
- Kim, I., Pollit, E., Leibel, R.L., *Pediatr Res*; 18: 916 (1984).
- Kirchhoff, L.V., Keiko, O., US20040132077 A1 (2004).
- Kirchhoff, L.V., Keiko, O., US6228601 B1 (2001).
- Kitano, H., Iwai, S., Okubo, T., Ise, N., *J.Am.Chem. Soc.*, 109:7608 (1987).
- Kitano, H., Nakamura, K., Ise, N., Abstracts, 2nd Polymer Microspheres Symposium, Fukui, November, 123 (1982).
- Kloetzel, J., Camargo, M.E., Giovannini, V.L., *J Protozool*; 22:259 (1975).
- Koning, B.L.J.C., Pelssers, E.G.M., Verhoeven, A.J.C.M., Kamps, K.M.P., *Colloids Surfaces B*, 1, 69 (1993).
- Koppel, D.E., *J. Chem. Phys.* 57, 4814 (1972).
- Kourti, T., Ph.D. Thesis, McMaster University, Canada, 1989.
- Krautz, G.M., Peterson, J.D., Godsel, L.M., Krettli, A.U., Engman, D.M., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 58(2):137 (1998).
-

-
- Krieger, M.A., Almeida, E., Oelemann, W., Lafaille, J.J., Pereira, J.B., Krieger, H., Carvalho, M.R., Goldenberg, S., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 46:274-434 (1992)
- La Vaille, E. A. Di Blasio, S. Kovacic, K. L. Grant, P. F. Schendel, J. M. McCoy. *Biotechnology*, 11, 187-198 (1993).
- Labib, M.E., Robertson, A.A., *J. Colloid Interf. Sci.*, 67/3, 543-547 (1978).
- Labib, M.E., Robertson, A.A., *J. Colloid Interface Sci.*, 77, 151 (1980).
- Laemmli, U.K., *Nature*, 227: 680-685 (1970)
- Langone, J.J., Van Vunakis, H., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 10:163 (1975).
- Lauritzen, E. Tuchsén, P. E. Hansen, O. Skovgaard, *Prot. Expr. Purif.*, 2: 372 (1991)
- Lefkovits, I., Pernis, P., *Immunological Methods*. Academic Press (1997).
- Leroux, M.L., Rabson, J., Desjardins, *Clin Chem*, 30: 1.552 (1984).
- Leung, F.Y., Galbraith, L.V., Jablonsky, G., Henderson, A.R., *Clin Chem*; 35:1.435 (1989).
- Levin, M.J., Da Silveira, J.F., Frasch, A.C., Camargo, M.E., Lafon, S., Degrave, W.M., Rangel-Aldao, R., *FEMS Microbiol. Immunol.* 4: 11-19 (1991)
- Levitus, G., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Van Regenmortel, M.H., Levin, M. J., *Clin. Exp. Immunol.* 85: 413-417 (1991)
- Litchfield, W.J., Craig, A.R., Frey, W.A., Leflar, C.C., Looney, C.E., Luddy, M.A., *Clin. Chem.*, 30:1489 (1984)
- Litchfield, W.J., Craig, A.R., Frey, W.A., Leflar, C.C., Looney, C.E., Luddy, M.A., *Clin. Chem.*, 30, 1489 (1984).
-

-
- Liu, Y., Dong, G., Zhao, Y., *J. of Immunological Methods*, 124, 159-163 (1989).
- Lloset, M.A., Gugliotta, L.M., Meira, G.R., *Rubber Chem. & Tech.*, 69/4, 696 (1996).
- Lopez, G., Rojas, A., Tress, M., Valencia, A., *Proteins*, 69(8): 165 (2007).
- Lorca, M., Velosa, C., Munoz, P., Bahamonde, M.I., Garcia, A., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 52: 512-515 (1995)
- Lott, J.A., Lu, C.J., *Clin Chem.*, 37: 361 (1991).
- Lucas, L. J., Han, J., Yoon, J., *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 49: 106 (2006)
- Magalhães Andrade de Góes, A.C., Baroni de Moraes, M.T., de Castro Silveira, W., Trigueiros Araújo, I., de H'alluin, J., da Silva Souza, W., da Silva, J.G., Gagliardi Leire, J.P., *J. of Virological Methods*, 148:211 (2007).
- Manes, N.P., El-Maghrabi, M.R., *Arch. Biochem. Biophys.*, 438 (2): 125 (2005).
- Marchand, A., Van Lente, F., Galen, R.S., *Am J Clin Pathol*; 80: 369 (1983).
- Marcipar, I., Roodveldt, C., Corradi, G., Cabeza, M., Brito, M., Winter, L., Marcipar, A., Silber, A., *J. Clin. Microbiol.* 43:5498-5503 (2005).
- Marcipar, I.S., Olivares, M.L., Robles, L., Dekanty, A., Marcipar, A., Silber, A.M., *Protein Expr. Purif.*, 34: 1-7 (2004)
- Marcipar, I.S., Welchen, E., Roodveldt, C., Marcipar, J., Silber, A.M., *FEMS Microbiol Lett*; 220:149 (2003).
- Margel, S., Beitler, U., O'Farim, M., *J. of Cell Science*, 56, 157 (1982).
-

-
- Mendes, R.P., Hoshino-shimizu, S., Moura, da Silva, A.M., Mota, I., Heredia, R.A., Luquetti, A.O.,
J. Clin. Microbiol., 35:1829 (1997).
- Mendes, R.P., Shimizu-Hoshino, S., Da Silca, A.M.A., Mota, I., Heredia, R.A.G., Luquetti, A.O.,
Leser, P.G., *Journal of Clinical Microbiology*, 35(7):1829, (1997).
- Metz, C.E., *Invest Radiol*; 21: 720 (1986).
- Ministerio de Salud y Acción Social, Instituto Nacional de Parasitología "Doctor Mario Fatale Chabén" - Normas para el diagnóstico de la infección chagásica - Resolución ministerial 523/97, 1998.
- Miraballes, I., Martín, A., Hidalgo-Álvarez, R., *Journal Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 8 (10), 765 (1997).
- Miraballes-Martínez, I., Forcada, J., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 38:4230 (2000).
- Miraballes-Martínez, I., Martín-Molina, A., Galisteo-González, F., Forcada, J., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 39:2929 (2001).
- Miraballes-Martínez, I., Martín-Rodríguez, A., Hidalgo-Álvarez, R., *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 8 (10): 765, (1997)
- Miraballes-Martínez, I., Martín-Rodríguez, A., Hidalgo-Álvarez, R., *J. Dispersión Sci. and Technology*, 17, 321 (1996).
- Molina-Bolivar, J.A., Galisteo-González, F., Hidalgo-Álvarez, R., *J. Biomater Sci. Polymer Edn*, 9(10) 1089 (1998).
- Molina-Bolivar, J.A., Ortega-Vinesa, J.L., *Langmuir*, 15 (8): 2644 (1999).
-

-
- Molina-Bolívar, J.A., Tesis Doctoral, Universidad de Granada, España, 1999.
- Moncayo, A., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94 (Suppl. 1):401 (1999).
- Montagne, P., Laroche, P., Cuilliere, M.L., Varcin, P., Pau, B., Duheille, J., *J. Clin. Lab. Anal.*, 6, 24 (1992).
- Nolson. G. Fosberg, T. Moks, N. Hartmanis, M. Uhlém, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2, 569-575 (1992).
- Norde, W., Giacomelli, C., *Macromol. Symp.*, 145:125 (1999).
- Nustad, K., Ugelstad, J., Berge, A., Ellingsen, T., Schmid, R., Johansen, L., Börmer, O., *International Atomic Energy Agency*, 45 (1982).
- Okubo, M., Kamei, S., Tosaki, Y., Fukunaga, K., Matsumoto, T., *Colloid Polym. Sci.*, 265, 957 (1987).
- Okumura, T., Nagai, F., Yamamoto, S., Hashimoto, T., Ito, M., Sawada, H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72(2): 360 (2008).
- Okumura, T., Nagai, F., Yamamoto, S., Yamano, K., Oseko, N., Inouye, K., Oomura, H., Sawada, H., *J. of Virological Methods*, 119: 11 (2004).
- Organización Mundial de la Salud, Centro de Prensa - Nota N° 340 (2010) - www.who.int/entety/mediacentre/actsheets/fs340/es-31k
- Ortega-Vinuesa, J.L., Molina-Bolívar, J.A., Peula, J.M., Hidalgo-Álvarez, R., *J. Immunol. Methods*, 205, 151 (1997).
-

-
- Ortega-Vinuesa, L.J., Molina-Bolívar, J.A., Hidalgo-Álvarez, R., *J. Immunol. Methods*, 190, 29 (1996a).
- Pecora, R., *Plenum Press*, (1985)
- Pessoa, B.S., Vianna, M.A., *Parasitología Médica 9na Ed. Cap. 9* (1974).
- Peula, J.M., Hidalgo-Álvarez, R., Santos, R., Forcada, J., De Las Nieves, F.J., *J. Materials Sci.: Materials in Medicine*, 6, 779 (1995).
- Peula, J.M., Puig, J., Serra, J., de las Nieves, F.J., Hidalgo-alvarez, R., *Colloids Surface A: Physicochem Eng. Aspects*, 92, 127 (1994)
- Peula-García, J. A. Molina-Bolivar, J. Velasco, A. Rojas, F. Galisteo-González, *J. Colloid Interf. Sci.*, 245, 230-236 (2002).
- Pichot, C., Delair, T., Elaïssari, A., "Polymeric Dispersions: Principles and Applications", ed. J.M. Asua, 515, 1997.
- Polpanich, D., Tangboriboonrat, P., Elaïssari, A., Udomsangpetch, R., *Anal. Chem*, 79: 2690 (2007)
- Porath, J., Garlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G., *Nature*, 258:598 (1975)
- Pozo Rodríguez F., *Med Clín (Barc)*, 91:177-183 (1988b)
- Pozo Rodríguez, F., *Med Clin (Barc)*, 90:779-785 (1988a)
- Quast, G., Roch, A.M., Niveleau, A., Grange, J., Keolouanghot, T., Huppert, J., *J. Immunol. Methods*, 22, 165 (1978).
-

-
- Quesada, M., Puig, J., Delgado, J.M., Hidalgo-Álvarez, R., *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 9(9): 961 (1998).
- Quesada, M., Puig, J., Delgado, J.M., Peula, J.M., Molina, J.A., Hidalgo-Álvarez, R., *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 8: 303 (1996).
- Ramos, J., Martín-Molina, A., Sanz-Izquierdo, M.P., Rus, A., Borque, L., Hidalgo-Álvarez, R., Galisteo-Gonzalez, F., Forcada, J., *J. Polym. Sci., A, Polym. Chem*, 41:2401 (2003).
- Reed, S.G., Skeiky, A.W., Lodes, M.J., Houghton, R.L., Smith, J.M., McNeil, P.D., US6228372 B1 (2001).
- Ricker, D.M., Hebert, L.A., Rohde, R., Sedmak, D.D., Lewis, E.J., Clough, J.D., *Am J Kidney Dis.*, 18: 678 (1991).
- Robertson, E.A., Zweig, M.H., *Clin Chem.*, 27: 1.569 (1981).
- Rodrigues, A.M., *Trabajo de ascenso, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes*, pp 105 (1985).
- Rüchel, R., Steere, R. L., Erbe, E. F., *J. Chromatogr.*, 166:563 (1978).
- Ryan, E.D., Bilous, G., *Clin Biochem*; 16: 249 (1983).
- Sáenz, J.M., Asua, J.M., *J. Polym. Sci.A: Polym. Chem.* A33, 1511 (1995).
- Sáez-Alquezar, A., Luquetti, A.O., Borges-Pereira, J., Moreira, E.F., Gadahela, M., Garcia Zapata, M.T., Strugo Arruda, A.H., *Rev Patol Trop*; 26:343 (1997).
- Saez-Alquezar, A., Sabino, E.C., Salles, N., Chamone, D.F., Hulstaert, F., Pottel, H., Stoops, E., Zrein, M., *J. Clin. Microbiol.* 38: 851-854 (2000)
-

-
- Sakota, K., Okaya, T., *J. Appl. Polym. Sci.*, 20, 3265 (1976)
- Salazar, A., Gonzalez, V.D.G., Gugliotta, L.M., Meira, G.R., "Síntesis y Caracterización de Látex Monodispersos de Poliestireno con Funcionalidad Sulfato", Actas del IV Simposio Argentino de Polímeros, Córdoba, Argentina, 22-24 nov., p.157 (1999).
- Saldana, A., Souza, O.E., *J. Parasitol*; 82:363 (1996).
- Salles, N.A., Sabino, E.C., Cliquet, M.G., Eluf-Neto, J., Mayer, A., Almeida-Neto, C., Mendonca, M.C., Dorliach-Llacer, P., Chamone, D.F., Saez-Alquezar, A., *Transfusion*, 36:969-973 (1996)
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2^o Ed., (1989).
- Sánchez, B., Monteón, V., Reyes, P.A., Espinoza, B., *Arch Med Res*; 32:382 (2001).
- Santos, R.M., Forcada, J., *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 12: 173 (2001).
- Santos, R.M., Forcada, J., *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 37: 501 (1999).
- Santos, R.M., Forcada, J., *Prog. Colloid Polym. Sci.*, 100, 87 (1996).
- Santos-Pérez, R.M, Tesis Doctoral, Univ. del País Vasco, 1997.
- Sanz-Izquierdo, M.P., Martín-Molina, A., Ramos, J., Rus, A., Borque, L., Forcada, J., Galisteo-González, F., *Journal of Immunological Methods*, 287: 159 (2004).
- Sarobe, J. Molina-Bolivar, J.A., Forcada, J., Galisteo, F., Hidalgo-Álvarez, R., *Macromolecules*, 31(13): 4282 (1998).
- Sarobe, J., Forcada, J., *Colloid Polym. Sci.*, 274, 8-13 (1996).
-

-
- Sarobe, J., Miraballes, I., Molina, J.A., Forcada, J., Hidalgo-Álvarez, R., *Polymers for Advanced Technologies*, 7, 749 (1996).
- Schechter, M., Nogueira, N., *Mol Biochem Parasitol*; 29:37 (1988).
- Seradyn Technical Bulletin, Particle Technology División, "Recommended Adsorption and Covalent Coupling Procedures", 1-3, 1991.
- Shah, D.O., Chang, C., Schochetman, G., Cheng, K.Y., US20080096232 A1 (2008).
- Shapiro, A.L., Viñuela, E., Maizel, J.V.Jr., *Biochem Biophys Res Commun.*, 28(5):815 (1967).
- Shirahama, H., Suzawa, T., *Colloid Polym. Sci.*, 263, 141-146 (1985).
- Silveira, J.F., Umezawa, E.S., Luquetti, A.O., *Trends Parasitol*; 17:286 (2001).
- Singer, J.M., Plotz, J.M., *Am. J. Med.*, 21, 888 (1956).
- Slomkowski, S., Basinska, T., Miksa, B., *Polymers for Advanced Technologies*, 13:906 (2002).
- Smith, P., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.G., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., *Analytical Biochemistry*, 150:76 (1985).
- Smith, R., Ts'ao, Ch., *Am. J. Clinical Pathology*, 60:644 (1973).
- Smith, W.V., Ewart, R.H., *J. Chem. Phys.*, 16:592 (1948).
- Snyder, L., Champness, W., *Molecular Genetics og Bacteria*, (2003).
- Solana, M.E., Katzin, A.M., Umezawa, E.S., Miatello, C.S., *J Clin Microbiol*; 33:1456 (1995).
- Soto, M., Requema, J.M., Quijada, L., Alonso, C., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 3:387-391 (1996).
- Stolf, M., ISBT Brazil'92, São Paulo, Brazil, 195-205 (1992).
-

-
- Stolf, N.A., Higushi, L., Bocchi, E., *J Heart Transplant*; 6:307 (1987).
- Suen, C.H., Morawetz, H., *Makromol. Chem.*, 186, 255 (1985).
- Sugimoto, T., "Monodispersed Particles", Academic Press, Amsterdam, 2001.
- Tang, D. Zhang, D. Tang, H. Ai, *J. Immunol. Meth.*, 316, 144-152 (2006).
- Tanowitz, H.B., Kirchhoff, L.V., Simon, D., Morriss, S.A., Weiss, L.M., Wittner, *M.Clin. Microbiol. Rev.*, 5:400 (1992).
- Tarleton, R.L., Etheridge, R.D., WO2005111622 A2 (2005).
- Tibbetts, R.S., Kim, I.Y., Olson, C.L., Barthel, L.M., Sullivan, M.A., Winkquist, A.G., Miller, S.D., Engman, D.M., *Infection and Immunity*. 62: 2499 (1994).
- Tijssen, P., *Practice and Theory of Enzyme Immunoassay*, Elsevier, (1985).
- Tsaur, L., Fitch, R.M., *J. Colloid Interface Sci.*, 115, 450 (1987).
- Turková, J., *J. Chrom. B.*, 722:11 (1999).
- Tyler, K., Engman, D., *Int J Parasitol*; 131:472 (2001).
- Umezawa, E., Luquetti, A., Levitus, G., Ponce, C., Ponce, E., Henriquez, D., Revollo, S., Espinoza, B., Sousa, O., Khan, B., da Silveira, J., *J. Clin. Microbiol.* 42:449-452 (2004).
- Umezawa, E.S., Bastos, S.F., Coura, J.R., Levin, M.J., Gonzalez, A., Rangel-Aldao, R., *Transfusion*; 43:91 (2003).
- Umezawa, S. Bastos, M. Camargo, L. Yamauchi, M. Santos, A. Gonzalez, B. Zingales, M. Levin, O. Souza, R. Rangel-Aldao, J. F. Da Silveira, *J. Clin. Microbiol.*, 37, 1554-1560 (1999).
-

-
- Van Meirvene and Le Ray, *Parasite Immunology*, 16:77 (1985).
- Van Steirteghem, A.C., Zweig, M.H., Robertson, E.A., Bernard, R.M., Putzeys, G.A., Bieva, C.J., *Clin Chem*; 28:1.319 (1982).
- Vega, J.R., Gugliotta, L.M., Gonzalez, V.D.G., Meira, G.R., *J. of Col. and Int. Sci.*, 261, 74 (2003b).
- Vermeer, W. P., Giacomelli, C. E., Norde, W., *Biochim. Biophys. Acta*, 1526:61 (2001).
- Vexenat ,A.C., Santana, J.M., Teixeira, A.R.L., *Inst Med Trop São Paulo*; 38:177 (1996).
- Voller, A., Bidwell, D.E., Bartlett, A., *Bull. World Health Organ.*, 53:55 (1976).
- Wang, H., Zhang, Y., Yan, B., Liu, L., Wang, S., Shen, G., Yu, R., *Clinical Chemistry*, 52 (11): 2065 (2006).
- Weber, D. R., Douglass, L. E., Brundage, W. G., Stallkamp, T. C., *Amer. J. Med.*, 46: 234 (1969).
- Who, *Technical Report Series*, 811:95, (1974).
- Wild D, editor. *The Immunoassay Book*. New York: Stockton Press;(1994).
- Wu, S., Zhang, Y., *Bioinformatics*, 24:924 (2008).
- Wu, S.T., Zhang, Y., *Nucl Acids Res*, 35:3375 (2007).
- Yalow, R.S., Berson, S.A., *J. Clin. Invest.*, 39:1157 (1960).
- Yalow, R.S., Berson, S.A., *Nature.*, 184:1648 (1959).
- Yan, C., Zhang, X., Sun, Z., Kitano, H., Ise, N., *J. Appl. Polym. Sci.*, 40: 89 (1990).
- Yates, D.E., Ottewill, R.H., Goodwin, J.W., *J. Colloid Interf. Sci.*, 62/2, 356 (1977).
-

Zhang, Y., *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 69 (8) 108-117(2007)

Zhang, Y., Kihara, D., Skolnick, J., *Proteins*, 48:192 (2002).

Zhang, Y., Liu, X.S., Liu, Q.R., Wei, L., *Nucleic Acids Res.*, 34:3465 (2006).

Zrein, M.", US6458922 B1 (2002).

Zweig, M.H., Broste, S.K., Reinhart, R.A., *Clin Chem.*, 38: 1.425 (1992).

Zweig, M.H., Campbell, G., *Clin Chem*; 39:561 (1993).

Zweig, M.H., *Clin Chem*; 38: 163 (1992).

Zwetsloot, J.P.H., Leyte, J.C., *J. Colloid Interface Sci.*, 163, 362 (1996)