

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

SÍNTESIS CONTROLADA Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS LÁTEX-PROTEÍNA PARA DETECCIÓN DE TOXOPLASMOSIS AGUDA MEDIANTE PRUEBAS DE INMUNOAGLUTINACIÓN

Lic. Leandro Ezequiel Peretti

Director de Tesis: Dr. Luis M. Gugliotta

Co-director de Tesis: Dra. Verónica D. G. Gonzalez

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

A Theo
Mi barredor de tristezas

A Paula
Mi compañera

AGRADECIMIENTOS

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

Al Dr. Luis Gugliotta y a la Dra. Verónica Gonzalez, por su permanente apoyo y estímulo tanto profesional como humano; por su intensa dedicación durante cada día del desarrollo de esta Tesis Doctoral y por su infinita paciencia.

Al Laboratorio de Tecnología Inmunológica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL), a cada uno de sus integrantes y en especial al Dr. Iván Marcipar, por su inestimable colaboración.

Al Laboratorio Central de la Provincia de Santa Fe, y en especial a María Lili Dalla Fontana, por la provisión de los sueros y la predisposición desinteresada.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral por permitir el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

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

Al Grupo de Polímeros y Reactores de Polimerización del INTEC y a todos sus integrantes por hacer más humana esta profesión.

A mis padres, Marcela y Guillermo; y hermanos, Agostina y Lucas, por su ayuda y apoyo.

A Paula, por ser la mejor compañera, por su apoyo incondicional, por sus palabras de aliento y por compartir los buenos y malos momentos.

Y a Theo, que a su manera, también colaboró para que esta Tesis llegue a su fin.

RESUMEN

La Toxoplasmosis es una zoonosis causada por el parásito *Toxoplasma gondii* y está ampliamente distribuida a nivel mundial. Generalmente se presenta asintomática o con síntomas inespecíficos, y en la mayoría de los pacientes no es necesario ningún tipo de intervención médica. Sin embargo, existe la necesidad de hacer un diagnóstico precoz de infecciones recientes en varias situaciones, como en embarazadas y personas inmunocomprometidas. La Toxoplasmosis adquirida durante la etapa de gestación, principalmente en el primer trimestre, puede producir aborto o inducir malformaciones, hidrocefalia, macro o microcefalia y lesiones oculares. El diagnóstico adecuado y el tratamiento oportuno constituyen la mejor manera tanto para prevenir la transmisión transplacentaria, como para reducir la morbimortalidad y las secuelas de la Toxoplasmosis congénita.

El diagnóstico de la Toxoplasmosis se basa fundamentalmente en el análisis serológico, que consiste en la búsqueda de anticuerpos (Ac) específicos en suero. Una forma de detectarlos es mediante la técnica de inmunoaglutinación (IA), la cual emplea partículas de látex como soporte de biomoléculas, con el objetivo de amplificar la reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). En una reacción de IA, los complejos látex-proteína (CLP) son reconocidos por los Ac específicos presentes en los sueros de pacientes positivos. Cuando se encuentran en concentraciones adecuadas, los Ac reconocen y se unen a las proteínas antigénicas del complejo y forman una red de aglutinación, que puede ser observada a simple vista o empleando técnicas instrumentales. La técnica de IA presenta las ventajas de ser rápida, sencilla, económica y de gran utilidad para su utilización en tamizajes. En el caso específico de la Toxoplasmosis, cuando el suero del paciente resulta positivo, en particular en una embarazada, es muy importante poder discriminar entre las fases de la infección; es decir, si se trata de una infección reciente o pasada, resultando de interés estudiar si la IA podría ser útil para realizar dicha diferenciación.

Las proteínas antigénicas utilizadas en el desarrollo de reactivos de IA pueden ser: i) homogenato del parásito, que es una mezcla heterogénea de diversas proteínas; o ii) proteínas recombinantes diseñadas por ingeniería genética. Estas últimas presentan las ventajas de mayor reproducibilidad y la posibilidad de mejorar su especificidad. Además, en su producción se evita trabajar con el parásito vivo.

El objetivo de esta Tesis es obtener CLP útiles como reactivos de IA en la detección de Toxoplasmosis recientemente adquirida. El trabajo se puede dividir en cuatro etapas: a) síntesis controlada, limpieza y caracterización de látex funcionalizados; b) producción y cuantificación de las proteínas antigénicas del *Toxoplasma gondii*; c) sensibilización de las partículas con las proteínas; y d) aplicación de los distintos CLP en ensayos de IA.

En el Capítulo 1, se introducen los principales antecedentes y conceptos relacionados con: i) la síntesis y caracterización de látex poliméricos para aplicaciones en inmunodiagnóstico; ii) la producción, purificación y cuantificación de proteínas recombinantes; y iii) la obtención de complejos látex-proteína y su aplicación en ensayos de IA.

El Capítulo 2, se refiere a la síntesis de partículas de látex de poliestireno (PS) y de partículas con morfología núcleo-coraza (o “core-shell”), con tamaños, grupos funcionales y densidades de carga superficial controlados. Se sintetizaron látex cuasi-monodispersos de PS en un rango de diámetros de 100-1100 nm, por polimerización en emulsión o en dispersión. Los látex de PS se emplearon luego como siembras en copolimerizaciones en emulsión de estireno y de un monómero funcional; empleándose ácido metacrílico, para brindar a las partículas de funcionalidad carboxilo, o glicidil metacrilato, para obtener partículas con funcionalidad epoxi. Los látex obtenidos se caracterizaron, determinándose el tamaño de partícula, las densidades de carga y de grupos funcionales superficiales, la concentración crítica de coagulación y las propiedades electrocinéticas (movilidad electroforética y potencial Zeta).

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

En el Capítulo 4, se describe la preparación de los CLP mediante la adsorción física y/o la unión covalente de las proteínas antigénicas, sobre las partículas previamente sintetizadas. Se evaluó el efecto del tipo de superficie, del tamaño y de la densidad de grupos funcionales, sobre la cantidad de proteína acoplada. Se realizó la caracterización de los complejos, determinándose los tamaños medios de partícula, la concentración crítica de coagulación y las propiedades electrocinéticas. Además, se evaluó la antigenicidad de las proteínas unidas a las partículas de látex para determinar si las mismas mantenían su capacidad de reconocimiento de Ac específicos luego de la sensibilización de las partículas.

El Capítulo 5 trata la aplicación de los distintos CLP en ensayos de IA. En una primera instancia se utilizaron sueros controles para determinar las condiciones óptimas de reacción, es decir, aquellas que permiten la mayor discriminación de los sueros agudos respecto de los sueros crónicos y negativos. Posteriormente, los CLP se enfrentaron a un panel de sueros y se analizó el área bajo la curva ROC (del inglés, "Receiver Operating Characteristic") indicativa de la capacidad de cada CLP, para discriminar los sueros agudos de manera diferencial. La reacción Ag-Ac de IA se siguió instrumentalmente por turbidimetría, midiendo el cambio de absorbancia que ocurre al entrar en contacto el CLP con el suero del paciente.

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

Los trabajos realizados permitieron obtener partículas de látex sensibilizadas con Ag del *T. gondii*, que fueron evaluadas en ensayos de IA frente a un reducido panel de sueros. Los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales ensayadas, indican que los CLP podrían resultar adecuados como reactivos de IA para detectar la fase aguda de la Toxoplasmosis, aunque para confirmar estos resultados se debería evaluar un panel de sueros mayor.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a worldwide disease caused by the parasite *Toxoplasma gondii*. It usually develops with nonspecific symptoms and does not require medical intervention. However, an early diagnosis of recent infection is required in various situations, such as pregnant women and immunocompromised persons. Toxoplasmosis acquired during gestation, especially in the first trimester, can cause abortion or induce malformations, hydrocephalus, macro or microcephaly and eye damage. Precise diagnosis and quick treatment are the best way to prevent transplacental transmission and reduce morbidity and mortality.

Diagnosis of Toxoplasmosis is mainly based on serological tests, which involves searching for specific antibodies (Ab). One way to detect specific Ab in serum is by the latex agglutination test (LAT), which employs latex particles as support of biomolecules, in order to amplify the antigen-antibody (Ag-Ab) reaction. In the immunoagglutination assays (IA), latex-protein complexes (LPC) are recognized by specific Ab present in the sera of infected patients, thus producing immunoagglutination, which can be observed by naked eye or using instrumental techniques. LAT is a fast and cheap detection method, which results particularly useful for screening purposes. In the case of Toxoplasmosis, when the patient serum is positive and particularly in pregnant women, is very important to discriminate between the phases of the infection; i.e., whether it is a recent or a past infection.

Antigenic proteins used to develop LAT reagents may be: i) the homogenate of the parasite, which is a heterogeneous mixture of different proteins; or ii) recombinant proteins, which have the advantages of greater reproducibility and the possibility to improve specificity. In addition, working with the living parasite is avoided during the production of recombinant proteins.

The goal of this Thesis is to obtain LPC useful as LAT for detecting recently acquired Toxoplasmosis. The experimental work was divided into four stages: a) controlled synthesis, cleaning and characterization of functionalized latexes;

b) production and quantification of antigenic proteins of *T. gondii*; c) synthesis of the LPC, where latex particles were sensitized with the antigenic proteins; and d) application of the LPC in IA.

In Chapter 1, main concepts are introduced on: i) the synthesis and characterization of latex for immunodiagnostic; ii) the production, purification and quantification of recombinant proteins; and iii) the synthesis of LPC and their application in IA assays.

Chapter 2 considers the synthesis of polystyrene (PS) latex particles and of core-shell particles, with controlled sizes, functional groups and surface charge densities. Quasi-monodisperse PS latexes were synthesized in the 100-1100 nm diameter range, by either emulsion or dispersion polymerization. Such latexes were then used as seeds in emulsion copolymerizations of styrene (St) and a functional monomer (methacrylic acid or glycidyl methacrylate), thus producing particles with carboxyl or epoxy functionalities, respectively. Latexes were then characterized for determining mean particle diameters, surface charge and functional groups densities, critical coagulation concentration and electrokinetic properties (electrophoretic mobility and zeta potential).

Chapter 3 treats the production of antigenic proteins of *T. gondii* further used to sensitize latex particles. The homogenate, which is a mixture of proteins obtained from parasite lysis, and two acute phase recombinant proteins were obtained. Production of recombinant proteins involved their expression from transformed bacteria, their purification and quantification.

In Chapter 4, the production of LPC is considered by physical adsorption and / or covalent coupling of antigenic proteins onto the latex particles. The effect of particle diameter and surface charge density on the amount of coupled protein was evaluated. LPC characterization was performed by measuring mean particle sizes, critical coagulation concentration and electrokinetic properties. Furthermore, the antigenicity of the proteins bound to the latex particles was evaluated.

Chapter 5 deals with the application of the LPC in LAT. First, IA were performed against control sera to determine optimal reaction conditions able to maximize the discrimination of the acute serum with respect to negative and chronic sera. The LPC were then evaluated against a panel of sera, in order to analyze the sensitivity and specificity of the immunoassay. The immunoagglutination reaction was followed by

turbidimetry, measuring the absorbance change that occurs when the LPC take contact with the patient serum.

Finally, Chapter 6 shows main conclusions of the Thesis and suggestions for future work.

As a general conclusion it was possible to obtain latex particles coated with *T. gondii* antigens which were evaluated on IA assays against a reduced panel of sera. Under the tested experimental conditions, the LPC may be suitable as LAT reagents for detecting the acute phase of Toxoplasmosis, although they should be evaluated against a larger panel of sera to confirm the obtained results.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	ix
ÍNDICE GENERAL.....	xiii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xxi
CAPÍTULO 1: Consideraciones Generales	
1.1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. TOXOPLASMOSIS. PROBLEMÁTICA EN SALUD HUMANA Y ANIMAL.....	3
1.2.1. Generalidades de la Toxoplasmosis.....	3
1.2.1.1. Toxoplasmosis en Animales.....	6
1.2.1.2. Toxoplasmosis en Humanos.....	7
1.2.2. Diagnóstico y Tratamiento de la Toxoplasmosis.....	9
1.3. SÍNTESIS DE LAS PARTÍCULAS DE POLÍMERO.....	14
1.3.1. Producción de Partículas por Polimerización en Emulsión.....	14
1.3.2. Producción de Partículas por Polimerización en Dispersión.....	18
1.3.3. Síntesis de Partículas Funcionalizadas.....	20
1.4. LIMPIEZA Y CARACTERIZACIÓN DE LOS LÁTEX.....	23
1.4.1. Métodos de Limpieza.....	23

1.4.2.	Caracterización Morfológica y Superficial.....	26
1.4.2.1.	Caracterización de Tamaños de Partícula.....	26
1.4.2.2.	Caracterización Superficial de las Partículas.....	30
1.5.	PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS UTILIZADAS	36
1.5.1.	Síntesis de Proteínas Recombinantes.....	37
1.5.1.1.	Tecnología del ADN Recombinante.....	37
1.5.1.2.	Ventajas del Uso de Proteínas Recombinantes.....	40
1.5.2.	Estructura de las Proteínas.....	40
1.5.3.	Métodos Utilizados para la Cuantificación de Proteínas.....	42
1.5.3.1.	Método del Ácido Bicinconínico.....	42
1.5.3.2.	Cuantificación por Fluorometría.....	43
1.5.3.3.	Cuantificación por Absorbancia.....	43
1.5.3.4.	Cuantificación por Geles de Poliacrilamida.....	44
1.6.	SENSIBILIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS DE LÁTEX.....	44
1.6.1.	Interacción Látex-Proteína.....	45
1.6.2.	Evaluación de la Antigenicidad de las Proteínas Unidas a la Superficie de las Partículas	48
1.7.	APLICACIÓN DE LOS COMPLEJOS LÁTEX-PROTEINA EN ENSAYOS DE INMUNOAGLUTINACION.....	49
1.7.1.	Métodos de Inmunodiagnóstico Utilizados de Referencia.....	51
1.7.2.	Evaluación de un Inmunoensayo.....	53

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

2.1.	INTRODUCCION.....	57
------	-------------------	----

2.2.	TRABAJO EXPERIMENTAL.....	61
2.2.1.	Reacciones de Polimerización.....	61
2.2.1.1.	Materiales y Métodos.....	61
2.2.1.2.	Látex de Poliestireno por Polimerización en Emulsión.....	63
2.2.1.3.	Látex de Poliestireno por Polimerización en Dispersión.....	66
2.2.1.4.	Látex con Funcionalidad Carboxilo.....	69
2.2.1.5.	Látex con Funcionalidad Epoxi.....	71
2.2.2.	Limpieza de los Látex.....	74
2.2.3.	Caracterización de los Látex Sintetizados.....	74
2.2.3.1.	Determinación de los Diámetros Medios de Partícula.....	76
2.2.3.2.	Cálculo del Índice de Polidispersidad.....	79
2.2.3.3.	Determinación del Espesor de la “Hairy Layer”.....	82
2.2.3.4.	Caracterización Superficial.....	83
2.2.3.4a.	Cuantificación de los Grupos Sulfato.....	84
2.2.3.4b.	Cuantificación de los Grupos Carboxilo.....	86
2.2.3.4c.	Cuantificación de los Grupos Epoxi	87
2.2.3.5.	Estabilidad coloidal.....	89
2.2.3.5a.	Concentración Crítica de Coagulación	90
2.2.3.5b.	Movilidad Electroforética y Potencial Zeta	92
2.3.	CONCLUSIONES.....	94

CAPÍTULO 3: Obtención de Antígenos del *Toxoplasma Gondii*

3.1.	INTRODUCCIÓN.....	97
3.2.	TRABAJO EXPERIMENTAL.....	99
3.2.1.	Materiales.....	99

3.2.1.1.	Soluciones.....	99
3.2.1.2.	Medios de cultivo.....	101
3.2.2.	Obtención del Homogenato del <i>T. gondii</i>	101
3.2.3.	Obtención de las Proteínas Recombinantes.....	101
3.2.3.1.	Expresión de las Proteínas Recombinantes.....	102
3.2.3.2.	Purificación de las Proteínas Recombinantes.....	103
3.2.3.3.	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida	105
3.2.3.4.	Cuantificación de las Proteínas Recombinantes.....	108
3.2.4.	Caracterización de las Proteínas Utilizadas.....	112
3.2.5.	Evaluación de la Antigenicidad de las Proteínas Obtenidas.....	112
3.3	CONCLUSIONES.....	116

CAPÍTULO 4: Obtención de Complejos Látex-Proteína

4.1.	INTRODUCCION.....	119
4.2.	TRABAJO EXPERIMENTAL.....	121
4.2.1.	Adsorción Física.....	121
4.2.1.1.	Efecto de la Presencia de Emulsificante sobre la Adsorción Física.....	124
4.2.2.	Unión Covalente sobre Partículas con Funcionalidad Carboxilo.....	125
4.2.3.	Unión Covalente de P22Ag sobre Partículas con Funcionalidad Epoxi.....	133
4.2.4.	Caracterización de los Complejos Látex-Proteína.....	136
4.2.4.1.	Análisis de los Complejos Látex-Proteína mediante DLS.....	139
4.2.4.2.	Determinación de la Concentración Crítica de Coagulación de los Complejos Látex-Proteína.....	141
4.2.4.3.	Determinación de la Movilidad Electroforética y del Potencial Zeta de los Complejos Látex-Proteína.....	143

4.2.5.	Antigenicidad de las Proteínas Unidas a las Partículas Sintetizadas	143
4.3.	CONCLUSIONES.....	147

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

5.1.	INTRODUCCIÓN.....	151
5.2.	TRABAJO EXPERIMENTAL.....	154
5.2.1	Estudio de la Influencia de las Condiciones de Reacción Utilizando Sueros Controles.....	154
5.2.1.a.	Influencia del Tiempo de Reacción	155
5.2.1.b.	Influencia de la Fuerza Iónica del Medio y de la Presencia de Aditivos.....	157
5.2.2.	Comparación de los Diferentes Complejos Látex-Proteína Utilizando Sueros Controles	160
5.2.3.	Ensayos de Inmunoaglutinación Frente a un Panel de Sueros.....	167
5.3.	CONCLUSIONES.....	174

CAPÍTULO 6: Conclusiones y Sugerencias para Trabajos Futuros

6.1.	INTRODUCCIÓN.....	177
6.1.1.	Síntesis de las Partículas Poliméricas.....	178
6.1.2.	Caracterización de los Sistemas Coloidales.....	179
6.1.3.	Obtención de Antígenos del <i>Toxoplasma gondii</i>	180
6.1.4.	Síntesis y Caracterización de los Complejos Látex-Proteína. Evaluación de la Antigenicidad de las Proteínas Unidas a las Partículas.....	180
6.1.5.	Aplicación de los Complejos Látex-Proteína en Ensayos de Inmunoaglutinación	182

ABREVIATURAS.....	185
NOMENCLATURA.....	189
BIBLIOGRAFÍA.....	193

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
2.1. Recetas y condiciones de síntesis discontinua empleadas; y conversiones y diámetros medios de partícula finales alcanzados en las polimerizaciones en emulsión de estireno a 90 °C	64
2.2. Recetas y condiciones de síntesis discontinua empleadas; y conversiones y diámetros medios de partícula finales alcanzados en las polimerizaciones en dispersión de estireno a 70 °C	67
2.3. Recetas y tiempos de reacción empleados; y conversiones y diámetros de partícula finales alcanzados en las polimerizaciones presembradas y discontinuas en emulsión de estireno y ácido metacrílico a 70 °C.....	69
2.4. Recetas y tiempos de reacción empleados; y conversiones y diámetros de partícula finales alcanzados en las polimerizaciones presembradas en emulsión de estireno y glicidil metacrilato a 70 °C.....	72
2.5. Características de los látex de PS sintetizados en emulsión (S8 y S10) y en dispersión (S13), medidas sobre los látex lavados.....	76
2.6. Características de los látex con funcionalidad carboxilo sintetizados por polimerización presembrada en emulsión a partir de las siembras S8, S10 y S13.....	77
2.7. Características de los látex con funcionalidad epoxi sintetizados por polimerización presembrada en emulsión a partir de la siembra S8.....	78
3.1. Principales características de los antígenos recombinantes P35Ag y P22Ag.	111

4.1.	Principales características de los complejos látex-proteína obtenidos por adsorción física sobre los látex de PS S8 y S10.....	137
4.2.	Principales características de los complejos látex-proteína obtenidos por unión covalente de P35Ag sobre los látex carboxilados a pH 6 y C° en aumento. Resultados de los CLP obtenidos luego de la desorción con Tritón X-100.....	137
4.3.	Principales características de los complejos látex-proteína obtenidos por unión covalente de P22Ag sobre los látex carboxilados a pH 6 y C° en aumento. Resultados de los CLP obtenidos luego de la desorción con Tritón X-100.....	138
4.4.	Principales características de los complejos látex-proteína obtenidos por unión covalente de P22Ag sobre los látex epoxidados a pH 7 y C° en aumento Resultados de los CLP obtenidos luego de la desorción con Tritón X-100.....	138
4.5.	Principales características de los complejos látex-proteína obtenidos por unión covalente del homogenato de <i>T gondii</i> sobre los látex carboxilados a pH 6 y C° = 0,6 mg/m ² . Resultados de los CLP obtenidos luego de la desorción con Tritón X-100.....	139
5.1.	Complejos Látex-Proteína evaluados en ensayos de inmunoaglutinación...	160

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1.1. Taquizoitos de <i>Toxoplasma gondii</i> , teñidos con Giemsa, de una muestra de líquido peritoneal obtenido de un ratón inoculado con <i>T. gondii</i> . Imagen tomada de: http://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/	4
1.2. Ciclo biológico del <i>T. gondii</i> . Imagen tomada y adaptada de http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html	5
1.3. Precauciones para evitar la infección por el <i>T. gondii</i>	9
1.4. Esquema del proceso de polimerización en emulsión.....	17
1.5. Esquema del proceso de polimerización en dispersión.....	20
1.6. Algunas de las posibles estructuras y morfologías de las partículas de látex.....	21
1.7. Esquema del dispositivo empleado en la purificación de los látex por desplazamiento de suero, antes (a) y después (b) del proceso de limpieza..	25
1.8. Esquema y foto del equipo de dispersión de luz dinámica utilizado.....	27
1.9. Curvas típicas de valoración conductimétrica para una dispersión de partículas con grupos ácido fuerte y ácido débil.....	31
1.10. Curva típica de valoración potenciométrica (verde) y 1ª derivada (rojo)....	32
1.11. Esquema de la doble capa eléctrica de una partícula cargada negativamente.....	35
1.12. Esquema de los pasos a seguir para obtener una proteína recombinante.....	38

1.13.	Unión covalente entre un grupo amino y uno carboxilo, activado por una carbodiimida.....	47
1.14.	Esquema del mecanismo de interacción entre una biomolécula y un grupo epoxi sobre la superficie de una partícula. En primer lugar ocurre la adsorción física de la proteína (a), seguido por la unión covalente con el grupo epoxi (b). Adaptado de Mateo y col., 2002.....	48
1.15.	Estructura de un anticuerpo y regiones funcionales.....	50
1.16.	Curva de aglutinación durante la interacción Ag-Ac ante concentraciones variable de antígeno.....	53
1.17.	Representación esquemática de curvas ROC en dos situaciones extremas..	55
2.1	Esquema y foto del sistema de reacción empleado para llevar a cabo las polimerizaciones.....	62
2.2	Evolución de la conversión monomérica y de los diámetros medios de partícula medidos por DLS a 90° en función del tiempo de reacción, para la síntesis de los látex de PS S8, S9 y S10.....	65
2.3	Evolución de la conversión monomérica (a) y de los diámetros medios de partícula medidos por DLS a 90° (b) en función del tiempo de reacción para la síntesis de los látex de PS S11, S12, S13, S14 y S15.....	68
2.4.	Evolución de la conversión monomérica (a) y de los diámetros medios de partícula medidos por DLS a 90° (b) en función del tiempo de reacción, en la síntesis de los látex carboxilados S8C1, S8C2, S10C1, S10C2 y S13C1.....	70
2.5.	Evolución de la conversión monomérica (a) y del diámetro medio de partícula medido por DLS a 90° (b) en función del tiempo de reacción para la síntesis de los látex epoxidados S8E1 y S8E2.....	73

2.6.	Seguimiento del lavado del látex S8. Evolución de la conductividad eléctrica (a) y de la tensión superficial (b) del agua a la salida del sistema de lavado en función del volumen de agua desplazado (Las líneas de puntos indican la conductividad eléctrica y tensión superficial del agua ultrapura).....	75
2.7.	Diámetro medio de partícula medido por MDLS para los látex S8, S8C1, S8C2 y para un látex estándar de PS de 306 nm de diámetro nominal.....	79
2.8.	Micrografías de los látex: a) S10 (TEM), b) S10C1 (TEM), c) S10C2 (TEM), d) S8 (SEM), e) S8C1 (SEM), f) S8C2 (SEM), g) S8E1 (SEM), h) S8E2 (SEM), i) S13 (SEM), j) S13C1 (SEM). Magnificación TEM 12.000x. Magnificación SEM 10.000x.....	81
2.9.	Evolución de los diámetros medios de partícula de los látex S8, S8C1 y S8C2 frente a concentraciones variables de KBr. Las líneas de puntos indican los diámetros máximo (D_{max}) a baja fuerza iónica y mínimo (D_{min}) de partícula que permiten calcular el espesor de la “hairy layer”.....	83
2.10.	Valoración conductimétrica del látex de PS S10 para la determinación de los grupos sulfato superficiales.....	84
2.11.	Valoración conductimétrica del látex carboxilado S10C1 para la determinación de los grupos sulfato y carboxilo superficiales.....	86
2.12.	Valoración potenciométrica del monómero GMA (a) y del látex epoxidado S8E2 (b).....	88
2.13.	Determinación de la concentración crítica de coagulación del látex carboxilado S8C1. Evolución de los D_{DLS} al aumentar la concentración de KBr a pH 6.....	91
2.14.	Movilidad electroforética del látex de PS S8 y de los látex carboxilados	

S8C1 y S8C2 (a) y del látex de PS S10 y de los látex carboxilados S10C1 y S10C2 (b) en función del pH.....	93
2.15. Representación esquemática de la doble capa eléctrica en la superficie de un látex de PS y en otro de P(St/HEMA). Adaptado de Suzawa y Shirahama, 1991.....	94
3.1. Vector pET-32a(+) utilizado para la clonación de las proteínas recombinantes.....	102
3.2. Imagen del gel de SDS-PAGE de clones de <i>E. coli</i> transformados con el plásmido pET-32a(+)/P35Ag. 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 P35Ag, como resultado del agregado de IPTG.....	104
3.3. Proceso de purificación de las proteínas recombinantes en columnas de pseudoafinidad a Níquel.....	105
3.4. Representación esquemática de la preparación de un gel de poliacrilamida y de la electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE).....	106
3.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE). Calle 1: Marcador de Pesos Moleculares (kDa), calle 2: homogenato del <i>T. gondii</i> , calles 3 y 4: P35Ag y calles 5 y 6: P22Ag. Imagen modificada para su presentación.....	108
3.6. Resultado de SDS-PAGE obtenido al sembrar las distintas fracciones de 250 mM de imidazol recolectadas en la purificación de la proteína P22Ag, junto con una serie de muestras de BSA de concentraciones conocidas.....	109

3.7.	Curva de calibrado de BSA. Intensidad de pixel obtenida por el Software “Gel-Pro Analyzer” luego del procesamiento de la imagen del gel de poliacrilamida de la Fig. 3.6.....	109
3.8.	Estructura de las proteínas recombinantes P35Ag (a) y P22Ag (b) predichas por el servidor I-TASSER.....	112
3.9.	Esquema de protocolo seguido para la clasificación de los sueros mediante técnicas de referencia. IFI: Inmunofluorescencia Indirecta.....	113
3.10.	Procedimiento para determinar la actividad biológica de las proteínas recombinantes mediante ELISA.....	114
3.11.	Antigenicidad del homogenato del <i>T. gondii</i> . Densidad óptica (DO) a 450 nm obtenida al enfrentar el homogenato con sueros negativos, agudos y crónicos en ensayos de ELISA.....	115
3.12.	Antigenicidad del antígeno recombinante P35Ag. Densidad óptica (DO) a 450 nm obtenida al enfrentar P35Ag con sueros negativos, agudos y crónicos en ensayos de ELISA.....	115
3.13.	Antigenicidad del antígeno recombinante P22Ag. Densidad óptica (DO) a 450 nm obtenida al enfrentar P22Ag con sueros negativos, agudos y crónicos en ensayos de ELISA.....	116
4.1.	Representación esquemática del proceso de sensibilización de partículas de látex por adsorción física.....	122
4.2.	Adsorción física de las proteínas recombinantes P35Ag y P22Ag sobre 2 látex de poliestireno (S8 y S10) y 4 látex carboxilados (S8C1, S8C2, S10C1 y S10C2). Los porcentajes en las barras indican la fracción de proteína adsorbida respecto a la adicionada y las barras de error indican la desviación estándar para n = 3.....	123

<p>4.3. Adsorción física de las proteínas recombinantes P35Ag y P22Ag, y del homogenato del <i>T. gondii</i> sobre 2 látex de poliestireno (S8 y S10). Los porcentajes en las barras indican la fracción de proteína adsorbida respecto a la adicionada y las barras de error indican la desviación estándar para n = 3.....</p>	124
<p>4.4. Adsorción física de P35Ag sobre el látex S10, con y sin emulsificante MA-80. Los porcentajes sobre las barras indican la fracción de proteína adsorbida respecto a la adicionada y las barras de error indican la desviación estándar para n = 3.....</p>	125
<p>4.5. Esquema del proceso involucrado en la unión covalente de las proteínas con los grupos carboxilo superficiales activados por una carbodiimida soluble.....</p>	125
<p>4.6. Acoplamiento químico de P35Ag sobre los látex carboxilados S8C1 y S8C2 en función de la cantidad de proteína inicial a pH 5, 6 y 7. La densidad de proteína unida total (barras oscuras) es comparada con la unida luego de la etapa de desorción con Tritón X-100 (barras claras). Los porcentajes sobre las barras indican la fracción de proteína unida covalentemente y las barras de error indican la desviación estándar para n = 3.....</p>	127
<p>4.7. Acoplamiento químico de P35Ag sobre los látex carboxilados S10C1 y S10C2 en función de la cantidad de proteína inicial a pH 5, 6 y 7. La densidad de proteína unida total (barras oscuras) es comparada con la unida luego de la etapa de desorción con Tritón X-100 (barras claras). Los porcentajes sobre las barras indican la fracción de proteína unida covalentemente y las barras de error indican la desviación estándar para</p>	

n = 3.....	128
4.8. Porcentajes de P35Ag unida total (a) y P35Ag unida luego de la etapa de desorción con Tritón X-100 (b) respecto a la cantidad de proteína inicial, para los látex carboxilados S8C1, S8C2, S10C1 y S10C2. $C^{\circ}_{P35Ag} = 0,3$ mg/mL (barras marrones), $C^{\circ}_{P35Ag} = 0,6$ mg/mL (barras anaranjadas) y $C^{\circ}_{P35Ag} = 0,9$ mg/mL (barras verdes).....	129
4.9. Acoplamiento químico de P22Ag sobre los látex carboxilados S8C1, S8C2, S10C1 y S10C2 en función de la cantidad de proteína inicial a pH 6. La densidad de proteína unida total (barras oscuras) es comparada con la unida luego de la etapa de desorción con Tritón X-100 (barras claras). Los porcentajes sobre las barras indican la fracción de proteína unida covalentemente y las barras de error indican la desviación estándar para n = 3.....	131
4.10. Acoplamiento químico de P22Ag sobre el látex carboxilado S13C1 en función de la cantidad de proteína inicial a pH 6. La densidad de proteína unida total (barras oscuras) es comparada con la unida luego de la etapa de desorción con Tritón X-100 (barras claras). Los porcentajes sobre las barras indican la fracción de proteína unida covalentemente y las barras de error indican la desviación estándar para n = 3.....	132
4.11. Porcentajes de P22Ag unida total (a) y P22Ag unida luego de la etapa de desorción con Tritón X-100 (b) respecto a la cantidad de proteína inicial, para los látex carboxilados S8C1, S8C2, S10C1, S10C2 y S13C1. $C^{\circ}_{P22Ag} = 0,3$ mg/mL (barras marrones), $C^{\circ}_{P22Ag} = 0,6$ mg/mL (barras anaranjadas) y $C^{\circ}_{P22Ag} = 0,9$ mg/mL (barras verdes).....	132
4.12. Acoplamiento químico del homogenato de <i>T. gondii</i> sobre los látex	

<p>carboxilados S8C1, S8C2, S10C1 y S10C2 a pH 6 y concentración de proteína inicial de 0,6 mg/mL. La densidad de proteína unida total (barras oscuras) es comparada con la unida luego de la etapa de desorción con Tritón X-100 (barras claras). Los porcentajes sobre las barras indican la fracción de proteína unida covalentemente y las barras de error indican la desviación estándar para n = 3.....</p>	133
<p>4.13. Acoplamiento de BSA sobre los látex S8, S8E1 y S8E2 a pH 7 y concentración de proteína inicial de 1 mg/mL a baja (a, b) y alta (c, d) FI del medio. Efecto del tiempo de incubación: 1 día (a, c) y 6 días (b, d). Las barras oscuras indican la proteína unida total y las barras claras indican la proteína unida luego de la desorción con Tritón X-100 por 24 h. Los porcentajes en las barras indican la relación entre la proteína remanente luego de la desorción respecto a la proteína unida total.....</p>	135
<p>4.14. Acoplamiento de P22Ag sobre los látex S8E1 y S8E2 a pH 7 y concentración creciente de proteína inicial (0,3-0,5 mg/mL). Las barras oscuras indican la proteína unida total y las barras claras indican la proteína unida luego de la desorción con Tritón X-100 por 24 h. Los porcentajes en las barras indican la relación entre la proteína remanente luego de la desorción respecto a la proteína unida total.....</p>	136
<p>4.15. Diámetros medios medidos por MDLS (50°-120°) para el látex S8C2 y los 3 CLP obtenidos con diferente cantidad de P35Ag a pH 6.....</p>	140
<p>4.16. Comparación de las PLIDs del látex S8C2 y 3 CLP con cantidad creciente de P35Ag acoplada.....</p>	141
<p>4.17. Determinación de la c.c.c. por DLS a 90° a pH 8. Diámetro medio de partícula del complejo S8C1-P35Ag ($\Gamma = 3,43 \text{ mg/m}^2$) frente al agregado</p>	

de KBr.....	142
4.18. Movilidad electroforética de los látex carboxilados S8C1 y S8C2 (a); y S10C1 y S10C2 (b) junto a sus respectivos CLP obtenidos por unión covalente de P35Ag a pH 6 y a Γ_{P35Ag} creciente. La determinación de μ_e fue realizada a pH 8.	144
4.19. Resultados de ELISA obtenidos usando P35Ag y 6 CLP producidos por adsorción física y unión covalente (con similar $\Gamma_{P35Ag} = 3,0-3,7 \text{ mg/m}^2$). Los números sobre las barras indican la relación DO_{ag}/DO_{neg} (negrita) y la relación DO_{ag}/DO_{cr} (normal). Las barras de error representan el rango entre muestras duplicadas.	145
4.20. Resultados de ELISA obtenidos usando P22Ag y 6 CLP producidos por adsorción física y unión covalente (con similar $\Gamma_{P22Ag} = 2,4-3,0 \text{ mg/m}^2$). Los números sobre las barras indican la relación DO_{ag}/DO_{neg} (negrita) y la relación DO_{ag}/DO_{cr} (normal). Las barras de error representan el rango entre muestras duplicadas.....	145
4.21. Resultados de ELISA obtenidos usando homogenato de <i>T. gondii</i> y 6 CLP producidos por adsorción física y unión covalente (con similar $\Gamma_{Hom} = 1,2-2,3 \text{ mg/m}^2$). Los números sobre las barras indican la relación DO_{ag}/DO_{neg} (negrita) y la relación DO_{ag}/DO_{cr} (normal). Las barras de error representan el rango entre muestras duplicadas.....	146
5.1. Esquema del proceso de inmunoaglutinación.....	153
5.2. Influencia del tiempo de reacción durante el ensayo de IA, utilizando sueros controles. Evolución de la absorbancia a 570 nm del complejo S8C1-P35Ag ($\Gamma_{P35Ag} = 3,04 \text{ mg/m}^2$) en ausencia del suero y después de	

mezclarlo con sueros negativo, agudo y crónico.....	156
5.3. Evolución del cociente entre la ΔA correspondiente al suero agudo y la ΔA para el suero negativo ($\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$); y del cociente entre la ΔA correspondiente al suero agudo y la ΔA para el suero crónico ($\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$) en función del tiempo de reacción.....	156
5.4. Variación de absorbancia por la adición de sueros controles negativo, agudo y crónico sobre el complejo S8C2-P35Ag ($\Gamma_{P35Ag} = 3,43 \text{ mg/m}^2$) después de 5 minutos de reacción a: a) baja fuerza iónica (20 mM); y b) alta fuerza iónica (150 mM). Los números sobre las barras indican las relaciones $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$ (negrita) y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$	158
5.5. Variación de absorbancia por la adición de sueros controles negativo, agudo y crónico sobre el complejo S8C2-P35Ag ($\Gamma_{P35Ag} = 3,43 \text{ mg/m}^2$) después de 5 minutos de reacción a: a) baja fuerza iónica (20 mM) y en presencia de glicina (0,1 M); y b) alta fuerza iónica (150 mM) y en presencia de glicina (0,1 M). Los números sobre las barras indican las relaciones $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$ (negrita) y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$	158
5.6. Variación de absorbancia por la adición de sueros controles negativo, agudo y crónico sobre el complejo S8C2-P35Ag ($\Gamma_{P35Ag} = 3,43 \text{ mg/m}^2$) después de 5 minutos de reacción a: a) baja fuerza iónica (20 mM) y en presencia de glicina (0,1 M) y PEG 8000 (3%); y b) alta fuerza iónica (150 mM) y en presencia de glicina (0,1 M) y PEG 8000 (3%). Los números sobre las barras indican las relaciones $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$ (negrita) y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$	159
5.7. Resultados del ensayo de inmunoaglutinación con sueros controles para 6	

CLP obtenidos por UC y AF de P35Ag. Los CLP investigados fueron aquellos obtenidos a pH 6 y $C^{\circ}_{P35Ag} = 0,6$ mg/mL. Se representa el cambio de absorbancia (ΔA) observado a los 5 minutos de mezclar el CLP con los sueros negativo, agudo o crónico. Los números sobre las barras indican las relaciones $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$ (negrita) y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$. Complejos S8C1-P35Ag (a), S8C2-P35Ag (b), S10C1-P35Ag (c), S10C2-P35Ag (d), S8-P35Ag (e) y S10-P35Ag (f)..... 161

5.8. Resultados del ensayo de inmunoaglutinación con sueros controles para 6 CLP obtenidos por UC y AF de P22Ag. Los CLP investigados fueron aquellos obtenidos a pH 6 y $C^{\circ}_{P22Ag} = 0,6$ mg/mL. Se representa el cambio de absorbancia (ΔA) observado a los 5 minutos de mezclar el CLP con los sueros negativo, agudo o crónico. Los números sobre las barras indican las relaciones $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$ (negrita) y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$. Complejos S8C1-P22Ag (a), S8C2-P22Ag (b), S10C1-P22Ag (c), S10C2-P22Ag (d), S13C1-P22Ag (e) y S8-P22Ag y S10-P22Ag (f)..... 162

5.9. Resultados del ensayo de inmunoaglutinación con sueros controles para 2 CLP obtenidos por UC de P22Ag sobre los látex epoxidados S8E1 y S8E2. Los CLP investigados fueron aquellos obtenidos a $C^{\circ}_{P22Ag} = 0,5$ mg/mL. Se representa el cambio de absorbancia (ΔA) observado a los 5 minutos de mezclar el CLP con los sueros negativo, agudo o crónico. Los números sobre las barras indican las relaciones $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$ (negrita) y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$. Complejos S8E1-P22Ag (a) y S8E2-P22Ag (b)..... 163

5.10. Resultados del ensayo de inmunoaglutinación con sueros controles para 6 CLP obtenidos por UC y AF del homogenato del *T. gondii*. Los CLP

investigados fueron aquellos obtenidos a pH 6 y $C^{\circ}_{Hom} = 0,6$ mg/mL. Se representa el cambio de absorbancia (ΔA) observado a los 5 minutos de mezclar el CLP con los sueros negativo, agudo o crónico. Los números sobre las barras indican las relaciones $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$ (negrita) y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$. Complejos S8C1-Homogenato (a), S8C2-Homogenato (b), S10C1-Homogenato (c), S10C2-Homogenato (d), S8-Homogenato (e) y S10-Homogenato (f).....	166
5.11. Resultados del ensayo de inmunoaglutinación cuando se evaluó el CLP S8C2-P35Ag frente a un panel de sueros negativos, agudos y crónicos. a) Distribución de ΔA , b) Curva ROC construida entre los siguientes grupos: i) sueros agudos (n=10) y ii) sueros negativos + crónicos (n=30).....	169
5.12. Resultados del ensayo de inmunoaglutinación cuando se evaluó el CLP S8C2-P22Ag frente a un panel de sueros negativos, agudos y crónicos. a) Distribución de ΔA , b) Curva ROC construida entre los siguientes grupos: i) sueros agudos (n=10) y ii) sueros negativos + crónicos (n=30).....	170
5.13. Resultados del ensayo de inmunoaglutinación cuando se evaluó el CLP S8C2-Hom frente a un panel de sueros negativos, agudos y crónicos. a) Distribución de ΔA , b) Curva ROC construida entre los siguientes grupos: i) sueros agudos (n=10) y ii) sueros negativos + crónicos (n=30).....	171
5.14. Comparación entre las distribuciones relativas ($\Delta A/cut-off$) obtenidas cuando se evaluaron los 3 CLP seleccionados (S8C2-P35Ag, S8C2-	

	P22Ag y S8C2-Hom) frente a un panel de sueros. La línea de puntos indica $\Delta A/cut-off = 1$	172
5.15.	Resultados del ensayo de inmunoaglutinación cuando se evaluó el CLP S8E1-P22Ag frente a un panel de sueros negativos, agudos y crónicos. a) Distribución de ΔA , b) Curva ROC construida entre los siguientes grupos: i) sueros agudos (n=10) y ii) sueros negativos + crónicos (n=30)...	173
5.16.	Comparación entre las distribuciones relativas ($\Delta A/cut-off$) obtenidas cuando se evaluaron los CLP S8C2-P22Ag y S8E2-P22Ag frente a un panel de sueros. La línea de puntos indica $\Delta A/cut-off = 1$	174

CAPÍTULO 1:

Consideraciones Generales

1.1. INTRODUCCIÓN

Los látex de inmunodiagnóstico se han utilizado exitosamente para la detección de Artritis Reumatoidea, Malaria, Brucelosis, Leptospirosis, Rotavirus, Virus Influenza Aviar, Enfermedad de Chagas, entre otros (Cohen y Benedek, 1975; Quast y col., 1978; Litchfield y col., 1984; Kapmeyer y col., 1988; Kapmeyer, 1991; Montagne y col., 1992; Basinska y Slomkowski, 1993; Peula y col., 1995; Santos y Forcada, 1996; Quesada y col., 1996; Sarobe y col., 1996; Ortega-Vinuesa y col., 1996; Miraballes-Martínez y col., 1997; Molina-Bolivar y Ortega-Vinuesa, 1999; Peula y col., 2002; Ramos y col., 2003; Okumura y col., 2004; Lucas y col., 2006; Wang y col., 2006; Chen y col., 2007; Dey y col., 2007; Magalhães Andrade y col., 2007; Polpanich y col., 2007; Jiang y col., 2008; Okumura y col., 2008; Gonzalez y col., 2008a, 2008b, 2010; Miranda y col., 2009; Yang y col., 2010; Moraveji y col., 2012; Garcia y col., 2013, 2014). En el desarrollo de estos reactivos, se sensibilizan partículas de látex monodispersas con antígenos (Ag) de interés, o anticuerpos (Ac), de manera tal que ante la presencia de Ac (o Ag) específicos en un fluido biológico, se produzca la aglutinación de las mismas. La detección de la inmunoaglutinación (IA) se puede realizar visualmente o mediante métodos instrumentales. El método visual (Quast y col., 1978; Kitano y col., 1987; Okubo y col., 1987; Basinska y Slomkowski, 1993; Peula y col., 1994) es simple y rápido, y no requiere equipamiento especial. Sin embargo, sus resultados son subjetivos e inadecuados para la cuantificación. Las técnicas instrumentales generalmente usadas para este propósito son: turbidimetría, nefelometría, y dispersión de luz dinámica (DLS, del inglés “Dynamic Light Scattering”). La sensibilidad (S) y especificidad (E) del inmunoensayo depende del método usado para detectar la aglutinación (Molina-Bolivar y Galisteo-González, 2005). Los reactivos de IA presentan la ventaja de ser rápidos, simples y de bajo costo.

El anclaje de las biomoléculas sobre las partículas de látex se puede realizar mediante adsorción física (AF) o mediante unión covalente (UC). En la adsorción pasiva puede ocurrir cierta desnaturalización de las proteínas al ponerse en contacto con la superficie de las partículas. Además, es parcialmente reversible, pudiendo ocurrir que el inmunoreactivo pierda paulatinamente su actividad por desorción del Ac o Ag utilizado (Hidalgo-Álvarez y Galisteo-González, 1995). También es posible que algunas moléculas no se desorban totalmente, pero sí lo hagan algunos fragmentos, que luego pueden readsorberse en otra conformación, alterando el comportamiento del reactivo. A los problemas anteriores, pueden sumarse reacciones de aglutinación inespecíficas. Buena parte de dichos inconvenientes se evitan si la proteína se une covalentemente a grupos funcionales presentes en la superficie de las partículas del látex. En este caso, la inmunoreactividad del Ag o Ac unido se mantiene en el tiempo, porque ocurre una mínima desnaturalización en la superficie y por la ausencia de desorción. Para el acoplamiento covalente de las proteínas, se emplean látex hidrofílicos funcionalizados de tamaño de partícula y densidad de grupos funcionales uniformes. La naturaleza hidrofílica aumenta la estabilidad de los complejos látex-proteína (CLP), y previene interacciones inespecíficas (Elwing y col., 1988). La uniformidad en el tamaño y en la densidad de grupos funcionales, aumenta la estabilidad coloidal y permite una distribución homogénea de las proteínas sobre la superficie de las partículas. La unión de las proteínas es fuertemente influenciada por el medio; y la fuerza iónica (FI) o su pH pueden afectar la cantidad de proteína unida (Bale y col., 1989).

Los látex generalmente usados para el acoplamiento covalente de proteínas, son típicamente partículas de poliestireno (PS), conteniendo grupos funcionales superficiales tales como aldehído, acetal, amino, carboxilo, clorometilo y epoxi (Maehara y col., 1987; Forcada e Hidalgo-Álvarez, 2005). Existen al menos dos procesos que permiten sintetizar partículas funcionalizadas mediante la copolimerización entre un monómero principal (el estireno: St) y un comonómero funcional. El proceso más simple es el discontinuo “no sembrado”, donde los monómeros se cargan y polimerizan en una sola etapa (Delair y col., 1994; Ganachaud y col., 1995). Alternativamente, se puede usar un proceso en dos etapas, que normalmente conduce a látex del tipo núcleo-coraza o “core-shell”. El mismo consiste en copolimerizar los comonómeros sobre una siembra de partículas monodispersas previamente sintetizadas (polimerización sembrada). Dicha copolimerización se puede

efectuar también de manera discontinua o semicontinua. En este último caso puede resultar conveniente adicionar la mezcla de monómeros a altas conversiones (polimerización impulsiva o en “shot”), para aumentar la densidad de carga superficial (Kling y Ploehn, 1995; Sarobe y Forcada, 1996; Gonzalez y col., 2008a).

En este Capítulo se introducen los principales temas a considerar en el desarrollo de la Tesis. Primero, se analiza la problemática de la Toxoplasmosis en la salud humana y animal. Luego, se considera la síntesis de partículas de polímero y su caracterización; la producción y purificación de proteínas recombinantes, y la obtención y caracterización de complejos látex-proteína. Finalmente, se examina la aplicación de dichos complejos en ensayos de inmunoaglutinación.

1.2. TOXOPLASMOSIS. PROBLEMÁTICA EN SALUD HUMANA Y ANIMAL

1.2.1. Generalidades de la Toxoplasmosis

El agente infeccioso causante de la Toxoplasmosis es el protozoario *Toxoplasma gondii*. Se trata de un parásito intracelular estricto de forma arqueada y que es capaz de infectar al hombre, mamíferos y aves. En la Fig. 1.1 se puede observar una imagen obtenida por microscopio óptico de taquizoítos, uno de los estadios que puede adoptar el *T. gondii*, teñidas con el colorante Giemsa, que se utiliza comúnmente para el análisis de protozoos. Su forma arqueada es el origen del nombre del parásito, en griego “toxos” significa “arcos” y “plasma” significa “forma”.

Los mamíferos y las aves pueden ser hospederos del *T. gondii*, aunque sólo los felinos son hospederos definitivos del parásito, donde se desarrolla su ciclo biológico completo. El *T. gondii* se multiplica en los hospederos y por ser un parásito intracelular estricto se localiza en el interior de las células, lo que lo protege de los Ac circulantes del hospedero. Presenta tres estadios con capacidad infectante:

Taquizoitos: Este estadio es de multiplicación rápida y su localización reside en los tejidos del cuerpo. Puede encontrarse en casi cualquier órgano, pero principalmente

en el cerebro y los músculos. Cuando el animal muere, es capaz de sobrevivir por pocas horas.

Bradizoitos: En este estadio la multiplicación es lenta y se encuentran en quistes tisulares. Puede vivir días después de la muerte del animal pero se destruye a 60 °C.

Esporozoitos: Se encuentran localizados en ooquistes que se excretan en las heces de felinos. Pueden sobrevivir en condiciones ambientales hasta 1 año; sin embargo son destruidos por calor seco a 70 °C, agua hirviendo, yodo concentrado y soluciones de amoníaco concentrado.

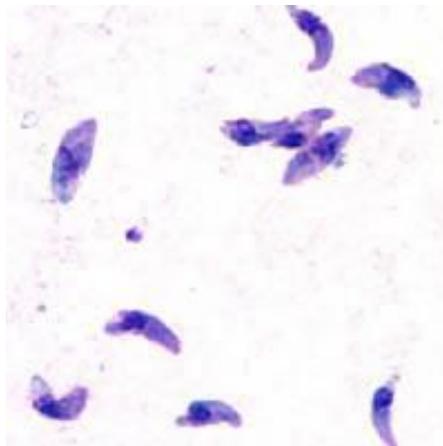


Fig. 1.1. Taquizoitos de *Toxoplasma gondii*, teñidos con Giemsa, de una muestra de líquido peritoneal obtenido de un ratón inoculado con *T. gondii*. Imagen tomada de: <http://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/>.

Los ooquistes sólo se producen en los intestinos de los hospederos definitivos (felinos), donde se presenta un ciclo intestinal; mientras que en los hospederos intermediarios sólo se desarrolla un ciclo extraintestinal. En la Fig. 1.2 se muestra un esquema del ciclo biológico del *T gondii*.

La infección de un felino puede ocurrir luego de: i) la ingestión de carnes con quistes tisulares, provenientes de sus presas o de carnes mal cocidas; ii) el consumo de alimentos contaminados con ooquistes esporulados y iii) la vía transplacentaria.

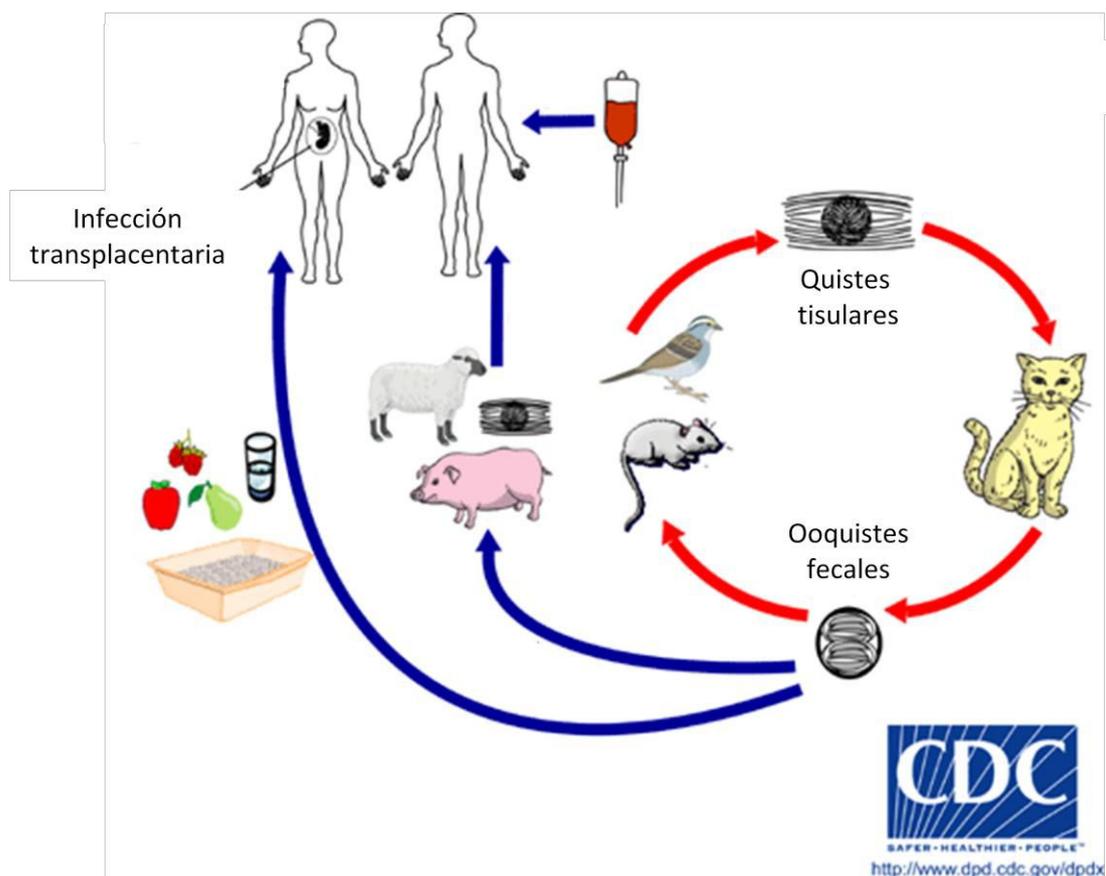


Fig. 1.2. Ciclo biológico del *T. gondii*. Imagen tomada y adaptada de <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>.

Después de la ingestión de los quistes tisulares, las enzimas proteolíticas presentes en el estómago y en el intestino delgado destruyen la pared quística y se liberan los bradizoítos. Estos ingresan a las células epiteliales del intestino e inician una serie de generaciones asexuales determinadas genéticamente, las cuales son seguidas por un ciclo sexual, con formación de gametos masculinos y femeninos. Los gametos masculinos fertilizan a los femeninos y se forma el ooquiste que pasa a las heces fecales de forma no esporulada, careciendo aún de capacidad infectante. Sin embargo, al ponerse en contacto con el aire, y luego de pasar por un proceso de diferenciación, esporulan y son capaces de infectar. La esporulación no se produce inmediatamente después de la excreción, sino que es afectada por las condiciones ambientales como humedad, temperatura y aireación. Por debajo de 4 °C, o por encima de 37 °C, no se produce la esporulación y los ooquistes no son infecciosos. El proceso de diferenciación dura hasta tres semanas y luego del mismo los ooquistes esporulados pueden mantenerse infecciosos durante mucho tiempo en la tierra húmeda (aproximadamente

un año). Por otro lado, los felinos eliminan ooquistes la primera vez que se infectan y lo hacen sólo durante un mes de su vida. Por lo tanto, un animal que se ha infectado en el pasado, cuando se infecte nuevamente, no liberará ooquistes con sus heces debido a que posee en su sistema inmune Ac de memoria que evitan que los mismos se desarrollen.

En el resto de los animales (también en los felinos) tiene lugar el ciclo extraintestinal. Las formas infectantes penetran por vía oral mediante la ingestión de carnes crudas o mal cocidas que contienen quistes tisulares, al consumir aguas contaminadas con ooquistes esporulados provenientes de heces fecales de felinos, y por vía transplacentaria.

El parásito penetra en la mucosa intestinal y se multiplica asexualmente en las células de las mucosas. Los organismos de multiplicación rápida son los taquizoitos. Los taquizoitos invaden células nucleadas, preferente del sistema nervioso, del músculo y de la placenta, y se desarrollan con rapidez hasta que la célula se destruye luego de llenarse de taquizoitos, liberándolos y permitiendo la infestación de otras células.

El *T. gondii* infecta a todas las células de los mamíferos, con excepción de los glóbulos rojos, en donde pueden ingresar pero no reproducirse. Luego de 2-3 semanas el huésped empieza a desarrollar inmunidad frente al agente extraño. La respuesta inmune disminuye la velocidad de multiplicación y los organismos que se multiplican con lentitud (bradizoitos) quedan encerrados en un quiste de pared clásica en el citoplasma de la célula infectada y la respuesta inmune del hospedero no puede destruirlos. Cada quiste puede contener desde centenas a millares de bradizoitos y pueden persistir durante toda la vida.

1.2.1.1. Toxoplasmosis en Animales

En general, la infección puede cursar con o sin sintomatología, lo que depende de factores ligados al parásito, como la cepa y la dosis infectante; o al hospedador, como la edad, el estado de las defensas y la gestación.

El gato generalmente adquiere la enfermedad cuando es muy joven (entre los 2 y 4 meses de edad) debido a que en ese momento comienza a consumir carne cruda, suministrada por su propietario, o a cazar presas bajo la supervisión de su madre.

Para los hospederos intermediarios la causa de infección más importante es el contacto con el suelo, donde están los ooquistes esporulados. Las cabras, ovejas y otros rumiantes que comen pasto pueden infectarse por este medio, así como las aves que comen en la tierra.

En los caprinos, además de causar aborto, la infección causa enfermedad y muerte de animales. En los ovinos la prevalencia serológica es variable, pudiendo llegar, en determinadas explotaciones hasta el 100 %. La infección toxoplásmica en los ovinos es asintomática, salvo que una primoinfección ocurra durante la preñez, en cuyo caso, provoca aborto. En algunos países como Nueva Zelanda, Australia, Inglaterra, Noruega, Francia y EE.UU, la Toxoplasmosis es una de las causas más importantes de aborto ovino. El curso de la Toxoplasmosis en cabras y ovinos tiene algunas diferencias. En ovinos los abortos se producen si la primoinfección ocurre durante la preñez y no se repiten, mientras que en las cabras, no se sabe si por reinfecciones o reactivaciones, se pueden repetir los abortos por Toxoplasmosis en el mismo animal. En cerdos, la mayoría de las infecciones son asintomáticas, pero puede producir enfermedad que se manifiesta por debilidad, tos, falta de coordinación, diarrea y mortalidad perinatal. Los conejos se enferman y pueden morir por Toxoplasmosis aguda, que cursa con hepatitis, neumonía y linfadenitis. Las gallinas y pollos se infectan, pero no manifiestan síntomas ni se detectan pérdidas en la producción. Finalmente, la Toxoplasmosis en perros puede manifestarse con síntomas neuromusculares, respiratorios y gastrointestinales.

1.2.1.2. Toxoplasmosis en Humanos

En el hombre, las formas infectantes penetran por vía oral mediante la ingestión de carnes crudas o mal cocidas que contienen quistes tisulares, al consumir aguas contaminadas con ooquistes esporulados provenientes de heces fecales de felinos, por transfusiones sanguíneas o trasplantes de órganos y por vía transplacentaria. En la mayoría de los casos, la infección cursa asintomática o con síntomas inespecíficos. La

respuesta inmune de personas sanas es efectiva para controlar la enfermedad. Sin embargo, existe la necesidad de hacer un diagnóstico precoz de infecciones recientes en varias situaciones:

i) En el caso de la primoinfección en el embarazo existe riesgo de transmisión al feto, lo cual puede llevar a una Toxoplasmosis congénita en 17 a 25 % de los casos, si se adquiere en el primer o segundo trimestre, y 65 % en el tercero (Frenkel, 1990).

ii) En los pacientes inmunocomprometidos, por el riesgo de desarrollar una complicación grave (por ejemplo la Toxoplasmosis cerebral), debido a reactivación con proliferación no controlada del parásito.

iii) En los recién nacidos con síntomas de síndrome TORCHS (sigla que agrupa los signos y síntomas producidos por las infecciones congénitas por *T gondii*, Rubéola, Citomegalovirus, Herpes Virus, Sífilis u otros) debido a las secuelas que puede ocasionar si no se hace un diagnóstico oportuno que permita el tratamiento precoz y que evite la aparición de las secuelas tardías como el retardo en el desarrollo psicomotor o la retinocoroiditis (Montoya y col., 1996).

Las infecciones intrauterinas de los fetos pueden ocasionar coriorretinitis, ceguera, hidrocefalia, calcificaciones intracerebrales, epilepsia, retraso mental o psicomotor y aborto. La infección del feto sólo se produce si la madre está cursando una infección aguda que en muchos casos es asintomática o puede presentar síntomas inespecíficos. Como consecuencia de la transmisión vertical del parásito se puede producir el aborto espontáneo o bien los niños nacer con distintos grados de patología; la mayoría no presenta síntomas en ese momento, aunque pueden aparecer las manifestaciones de la infección años después del nacimiento.

Para evitar la enfermedad, es recomendable cocinar bien las carnes que se consumen, lavar exhaustivamente y desinfectar las verduras que se consumirán crudas, siendo recomendable consumir alimentos en lugares donde pueda controlarse su preparación, utilizar guantes en la manipulación de tierra y lavarse con frecuencia las manos (Fig. 1.3).



Fig. 1.3. Precauciones para evitar la infección por el *T. gondii*.

1.2.2. Diagnóstico y Tratamiento de la Toxoplasmosis

El diagnóstico parasitológico de la Toxoplasmosis consiste en demostrar la presencia del parásito a través de: i) el aislamiento de los parásitos mediante inoculación en ratón o cultivo celular y ii) la demostración de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) del parásito mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés “Polymerase Chain Reaction”).

Ocasionalmente, pueden descubrirse los taquizoitos en extensiones del ganglio linfático, médula ósea, bazo y cerebro. El aislamiento es el procedimiento más fiable para demostrar el parásito, pero requiere de laboratorios altamente equipados. Para el aislamiento, una muestra del material sospechoso se inocula intraperitonealmente en ratones libres de infección natural por *Toxoplasma*. Algunas cepas son letales para los ratones en 5-12 días y los taquizoitos pueden observarse a partir de un frotis teñido con Giemsa de los exudados peritoneales de los animales.

La mayoría de las cepas del *Toxoplasma* no son letales para los ratones, pero causan una infestación crónica con quistes en los tejidos. Los ratones pueden ser

desangrados a las 6 semanas y hacerse preparaciones húmedas trituradas de cerebro y examinarlas buscando quistes.

El cultivo celular es una técnica delicada y sensible a contaminaciones, pero evidencia más rápidamente los parásitos que la inoculación en ratón. El cultivo se puede realizar a partir de diferentes muestras como líquido amniótico, sangre fetal, sangre de la madre, biopsias y lavado broncoalveolar. El examen directo de los cultivos al microscopio aporta poca información, pero la coloración de los cultivos por Giemsa e inmunofluorescencia directa permite identificar correctamente los parásitos después del cuarto día de incubación (Derouin y Thullize, 1994).

Otra forma de diagnóstico directo es evidenciar la presencia del *T. gondii* por la amplificación de un segmento del ADN del parásito por PCR. La técnica de PCR ha sido adaptada al diagnóstico de la Toxoplasmosis, utilizando como blancos de amplificación genes únicos o repetidos. Una de las grandes ventajas de la reacción de PCR es su extrema sensibilidad, que permite la detección a partir de un solo parásito, que equivale a 0,05-0,2 picogramos de ADN. Esta gran capacidad de detección crea la necesidad de utilizar estrictos protocolos para impedir resultados falsos positivos y también es importante la detección de inhibidores de la reacción de amplificación que pueden originar resultados falsos negativos (Kwok e Higuchi, 1989).

El diagnóstico indirecto es menos laborioso y más preciso que el aislamiento y consiste en demostrar la presencia de Ac específicos contra el *T. gondii* en muestras biológicas del paciente.

El diagnóstico en la embarazada está estandarizado de la siguiente manera: primero se utilizan pruebas de tamizaje con detección de inmunoglobulinas isotipo G (IgG) e inmunoglobulinas isotipo M (IgM) específicas, seguidas de estudios confirmatorios de IgM e inmunoglobulinas isotipo A (IgA) por captura y test de avidéz en laboratorios de referencia. En la práctica, el control y seguimiento pueden resultar de difícil implementación. En el recién nacido, títulos de IgG significativamente mayores al de la madre o la presencia de IgM y/o IgA, es fuerte indicio de infección prenatal. La persistencia de IgG específica al año confirma esta infección en el recién nacido.

Según el Consenso Argentino de Toxoplasmosis Congénita (Durlach y col., 2008) los principales métodos diagnósticos serológicos para Toxoplasmosis son:

1. *Reacción de Sabin-Feldman* (SF). Según la Organización Mundial de la Salud es la prueba de referencia para el diagnóstico de la Toxoplasmosis, considerando que es la de mayor S, E y reproducibilidad (Sabin y Feldman, 1949; Reiter-Owona y col., 1999; Press y col., 2005). La reacción utiliza toxoplasmas vivos y el mantenimiento de la cepa requiere de un bioterio o una línea de cultivo celular sólo disponible en laboratorios altamente especializados. Es una reacción de coloración donde los Ac específicos reaccionan con la membrana del parásito viable extracelularmente, en presencia del colorante azul de metileno básico. Si la muestra contiene Ac específicos, los mismos actúan lisando las células del parásito e impidiendo que el colorante las tiña; mientras que si no existen Ac específicos los parásitos se tiñen de azul.

2. *Inmunofluorescencia indirecta* (IFI). Se basa en que, en una primera etapa, el Ag (toxoplasmas liofilizados) fijado a un soporte reacciona con los Ac específicos. La reacción se visualiza en una segunda etapa al tomar contacto una anti-gammaglobulina marcada con fluoresceína con el Ac del complejo inmune. Puede usarse gammaglobulina específica IgM o IgG, estableciendo de esta manera el Ac que está reaccionando. Los títulos de IgG concuerdan satisfactoriamente con la reacción de SF (de Meuter y de Decker, 1975). La IFI anti-IgM o test de Remington tiene ciertas interferencias que dificultan su implementación. Por un lado, los títulos elevados de IgG pueden dar lugar a un resultado falso negativo y por el otro, el factor reumatoideo o el factor antinuclear pueden dar resultados falsos positivos. Por este motivo se requiere un pretratamiento con una anti-IgG, para eliminar la interferencia y la reacción tiende a negativizarse a partir de los 6 meses.

3. *Enzimoimmunoensayo* (ELISA, del inglés “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”). Este test consiste en la adsorción de Ag solubles del parásito sobre microplacas de poliestireno en las que se agrega luego el suero en estudio, convenientemente diluido. Posteriormente, agregando un antisuero conjugado con enzimas marcadoras y el sustrato adecuado a la enzima usada, se produce una reacción cromógena que indica identidad entre el Ag y los Ac estudiados. Existen numerosos equipos comerciales y la falta de uniformidad en el Ag y en la expresión de los resultados imposibilita la comparación entre ellos (Van Loon y Van der Veen, 1980). Algunos equipos tienen baja E, dando lugar a falsos positivos que dificultan el

diagnóstico. Para la detección de IgM es preferible la técnica de ELISA-IgM-Doble Sandwich que posee mayor S y E ya que se trata de un ELISA de captura.

4. *Prueba de inmunoabsorción y aglutinación (ISAGA, del inglés “Immunosorbent Agglutination Assay”)*. Es una técnica de inmunocaptura altamente sensible y específica. Es la técnica más sensible, con un 98 % de efectividad en las primoinfecciones. Consiste en una placa sensibilizada con anti-gammaglobulinas (puede ser de distintos isotipos), que capturan los Ac cuando se ponen en contacto con el suero. Luego se agrega una suspensión de parásitos estabilizados que aglutinan ante la presencia de los Ac capturados. Si la reacción es positiva se forma un manto difuso, mientras que si el suero es negativo los parásitos se depositan en el fondo de la microplaca, observándose un botón. Se utiliza también para la detección de IgM, IgA e inmunoglobulina isotipo E (IgE), como marcadores de la fase aguda de la infección en la embarazada y en el recién nacido. El hallazgo de estas Ig en sangre del recién nacido es indicio de infección prenatal, ya que las mismas no atraviesan la placenta (Yamamoto y col., 2000).

5. *Agglutinación directa (AD)*. Se basa en la capacidad de los Ac específicos de aglutinar frente a toxoplasmas enteros. Se utiliza una suspensión de toxoplasmas formulado como Ag que aglutinan al ponerse en contacto con los Ac específicos del suero, formando en los casos positivos un manto difuso y en los negativos un botón en la base del pocillo de la microplaca. Es una técnica sencilla y accesible a laboratorios de baja complejidad (Desmonts y col., 1974).

6. *Prueba de avidéz de los anticuerpos*. Se basa en la baja avidéz que presentan los Ac IgG por los Ag parasitarios en los primeros 3 a 5 meses de la infección. Con la maduración de la respuesta inmune los Ac adquieren mayor avidéz. En el primer trimestre de un embarazo la detección de Ac con alta avidéz, permite descartar una infección reciente. Una baja avidéz sugiere una infección reciente pero no es confirmatoria y se debe interpretar en el contexto del panel de reacciones realizadas (Jenum y col., 1997; Ferreira y Camargo, 2002; Lappalainen y Hedman, 2004).

Por la importancia de la patología en el niño, debería contarse con técnicas de alta S y sencillas, que puedan utilizarse en centros de atención primaria y que garanticen el diagnóstico de infección aguda en la madre y de infección reciente en el neonato.

Los distintos países han reglamentado el control de la embarazada en base a diferentes criterios. Austria legisló que los controles se deben realizar cada dos meses, mientras que en Francia es obligatorio realizar controles mensuales. El programa francés de prevención de la Toxoplasmosis se basa en el diagnóstico y tratamiento temprano de la embarazada. La vigilancia mensual de la mujer desde el primer trimestre de embarazo, permite el diagnóstico de la infección y su confirmación en las primeras semanas de la misma, y con ello un tratamiento más efectivo. Bélgica, Italia y Argentina han adoptado la conducta de realizar el primer estudio al principio del embarazo y los controles cada tres meses.

La prevalencia de Ac IgG anti-*T. gondii* en embarazadas evaluada en 9 hospitales de Buenos Aires y Conurbano, donde se atendieron cerca de 20.000 partos entre el 1º de mayo del 2006 y el 30 de abril del 2007, resultó en un 49 % (Carral y col., 2008). En otras provincias se registran valores menores, como por ejemplo los casos de la Provincia de Santa Fe (Red Provincial), donde el promedio fue 42,2 % y de la Provincia de Chaco, donde fue 23,8 % (Durlach y col., 2008). A pesar de la alta prevalencia de Ac IgG anti-*T. gondii*, los casos de infección aguda detectados durante el embarazo son bajos. En un estudio realizado en el Hospital Alemán de la ciudad de Buenos Aires se estudiaron 6.655 mujeres gestantes, de las cuales sólo 6 tuvieron una seroconversión (dos muestras tomadas en distintos momentos en el tiempo resultaron la primera negativa y la segunda positiva) y 14 presentaron un perfil serológico de infección aguda. Alrededor de un tercio de estas madres con infección aguda dará a luz un niño con Toxoplasmosis, siendo la frecuencia de la transmisión transplacentaria mayor hacia el final del embarazo.

El tratamiento específico debe realizarse en todo caso de infección aguda en embarazadas y durante el primer año de vida en niños que nacen infectados. Éste se realiza con espiramicina o bien con pirimetamina más sulfadiazina y ácido fólico. Estas drogas tienen efectos secundarios importantes, por lo que el diagnóstico seguro es fundamental para que el médico evalúe el balance riesgo/beneficio y decida si es oportuno realizar el tratamiento.

Los fármacos disponibles para el tratamiento de la Toxoplasmosis tienen efecto sólo sobre los microorganismos circulantes, pero no actúan sobre los quistes que se encuentran en los tejidos.

El diagnóstico adecuado y el tratamiento oportuno constituyen la mejor manera, tanto para prevenir la transmisión transplacentaria, como para reducir la morbimortalidad y las secuelas de la Toxoplasmosis congénita.

La Dra. Stella Maris González Cappa, investigadora Superior del CONICET y coordinadora de la Mesa de Implementación del núcleo socio productivo estratégico Enfermedades Infecciosas, del Plan Argentina Innovadora 2020, elaboró un documento de referencia donde menciona lo siguiente sobre la Toxoplasmosis: “si bien no es una enfermedad desatendida, por la gravedad de las lesiones que puede provocar la infección congénita, es de sumo interés poder contar con metodologías diagnósticas con adecuada sensibilidad y especificidad que permitan determinar sin lugar a duda la infección aguda de la embarazada para definir la oportunidad del tratamiento” (González Cappa, 2012).

1.3 SÍNTESIS DE LAS PARTÍCULAS DE POLÍMERO

1.3.1. Producción de Partículas por Polimerización en Emulsión

Las polimerizaciones en emulsión, cuya teoría fue establecida por Harkins (1946) y por Smith y Ewart (1948), ocupan un lugar destacado entre las técnicas de síntesis de polímeros. Estas polimerizaciones permiten obtener por vía radicalaria polímeros de muy alto peso molecular (PM) a altas velocidades de polimerización. El empleo de agua como medio de reacción permite un adecuado control de la temperatura (baja viscosidad y alta capacidad calorífica) y los productos obtenidos, comparados con los sintetizados por polimerizaciones en solución (donde se emplea un solvente orgánico como medio de reacción), son más amigables con el medio ambiente, menos tóxicos y más económicos de obtener.

Las dispersiones coloidales de partículas de polímero que se obtienen se denominan látex y se pueden obtener en una gran variedad de tamaños de partícula, morfología, grados de monodispersidad de tamaños y características superficiales, mediante la adecuada elección de la receta de reacción, las condiciones de la misma, el

tipo de reactor y las estrategias de operación. Por otra parte, estos sistemas coloidales están constituidos por partículas poliméricas de pequeño tamaño suspendidas en un medio acuoso, lo cual proporciona una gran área superficial para actuar de soporte de biomoléculas.

Se ha encontrado que los látex monodispersos, es decir que poseen un tamaño de partícula uniforme, son preferidos para el anclaje de biomoléculas, porque en estos casos la unión de proteínas tales como Ag o Ac a la superficie de las partículas es también uniforme, dando lugar a sistemas coloidales más estables. Para un látex de un contenido de sólidos determinado, el área superficial total aumenta cuando el tamaño de partícula disminuye y viceversa. Entonces, en un látex que presenta una distribución de tamaños de partícula (PSD, del inglés “Particle Size Distribution”) ancha, las partículas pequeñas tendrán mayor área expuesta capaz de interactuar con las biomoléculas que las partículas de mayor tamaño. Esto da lugar a una distribución desigual de proteínas unidas al látex, lo que conlleva a un pobre desempeño como reactivos de IA con fines diagnósticos.

Los principales componentes de una polimerización en emulsión son: i) agua, ii) los monómeros, iii) el emulsificante, y iv) el iniciador.

i) Agua: es la fase continua e inerte del sistema. Permite un adecuado control de la temperatura de reacción y actúa como el medio de transferencia del monómero desde las gotas a las partículas. En esta fase ocurre la descomposición del iniciador para dar lugar a radicales libres y al inicio de la polimerización. Además, se produce el intercambio dinámico del emulsificante entre las fases y a menudo la formación de oligómeros. Por lo general se utiliza agua deionizada, para evitar problemas de estabilidad, y además se debe desoxigenar porque el O₂ causa inhibición o retardo de la polimerización.

ii) Monómeros: son regularmente sustancias orgánicas, cuya estructura química tiene un gran impacto sobre las propiedades finales del polímero. Normalmente presentan baja solubilidad en agua, por lo que cuando se los pretende mezclar con agua el sistema se separa en 2 fases: la fase continua rica en agua (acuosa) y la fase dispersa rica en monómero (orgánica). En un sistema bien agitado, la fase orgánica se halla suspendida en forma de gotas, de tamaño micrométrico.

iii) Emulsificantes: son compuestos de bajo PM con carácter anfipático, es decir que normalmente contienen una larga cadena de naturaleza hidrofóbica con un extremo hidrofílico. Esto permite la formación de micelas, cuyo interior es hidrofóbico y las cabezas polares se orientan hacia el medio. Estas formaciones tienen lugar cuando la concentración del emulsificante 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 micelas. El monómero, de naturaleza hidrofóbica, encontrará en el interior de las micelas un ambiente compatible con su naturaleza. De esta forma las micelas cumplirán la función de ser sitios para la formación de partículas. Por otro lado, las moléculas del emulsificante estabilizan las gotas de monómero y las partículas de polímero producidas durante la polimerización. Los emulsificantes comúnmente utilizados en polimerización en emulsión son aniónicos, habitualmente en combinación con emulsificantes no iónicos que permiten controlar la morfología de las partículas de látex y mejorar la estabilidad coloidal post-polimerización. La cantidad de micelas es mayor cuando la concentración de emulsificante aumenta, siendo esta una variable que influye directamente sobre el tamaño de las partículas que se formen.

iv) Iniciador: suele ser una sal inorgánica soluble en agua que se disocia bajo determinadas condiciones (como por ejemplo elevada temperatura), 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.

Los tamaños de partícula que se pueden obtener por polimerización en emulsión dependen fundamentalmente de las concentraciones de emulsificante y de iniciador, y se logran obtener látex con tamaños medios entre 50 y 700 nm. En una polimerización en emulsión en presencia de emulsificante, éste se disuelve en agua y cuando su concentración supera la CMC, se generan micelas. Cuando se adiciona el monómero, parte del mismo se incorpora a las micelas, otra fracción forma gotas que quedan dispersas en el medio acuoso y una pequeña parte, dada por su solubilidad, 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 de las cadenas poliméricas. En la primera de ellas, el iniciador genera radicales libres en la fase acuosa a una velocidad que depende de su naturaleza, de la temperatura y del pH

del medio. Estos radicales propagan en fase acuosa con el monómero allí presente y una vez que adquieren cierta hidrofobicidad, entran a las micelas para reaccionar con el monómero que está dentro de ellas. Una vez que comienza la polimerización, la micela se transforma en una partícula de polímero hinchada con monómero, que es el principal sitio de polimerización. Debido a la compartimentalización de esta reacción en las partículas, la concentración de radicales y la velocidad de terminación en ellas es baja, lo que hace que los PM 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 que las partículas, aquellas no compiten con estas últimas en la captura de los radicales producidos en la fase acuosa (Fig. 1.4).

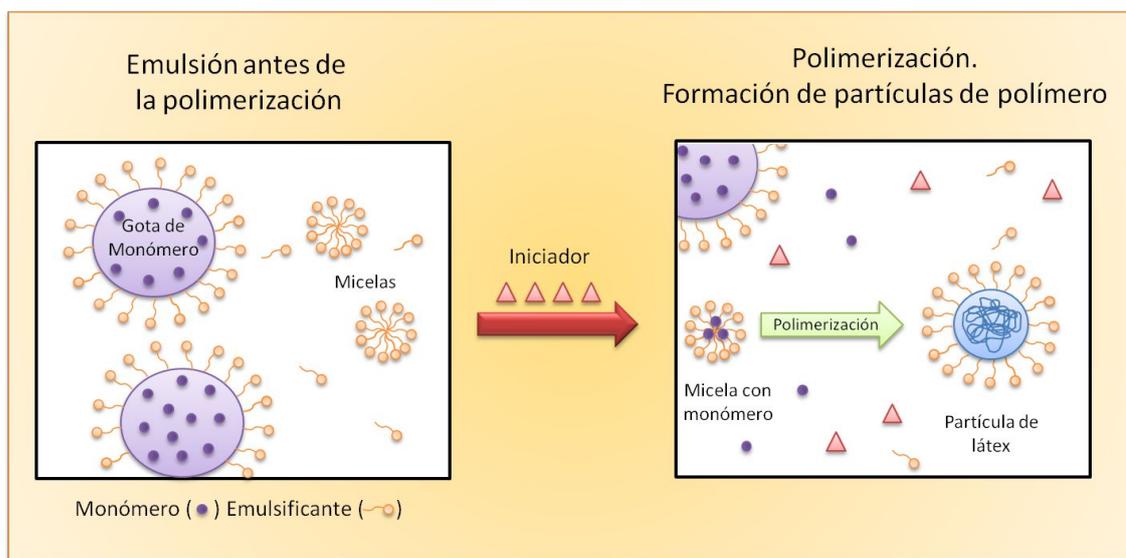


Fig. 1.4. Esquema del proceso de polimerización en emulsión.

1.3.2. Producción de Partículas por Polimerización en Dispersión

Partículas monodispersas de tamaños cercanos al micrón son generalmente difíciles de obtener porque este tamaño se encuentra en el medio de la gama de diámetros medios obtenidos por los procesos de polimerización heterogénea más conocidos. Así, por polimerización en emulsión convencional se pueden conseguir tamaños medios de partícula entre 50 y 700 nm; y por polimerización en suspensión se pueden sintetizar partículas con tamaños entre 50 y 1000 μm (Kawaguchi e Ito, 2005). Los primeros intentos de obtener partículas monodispersas de tamaños cercanos al micrón fueron llevados a cabo por Vanderhoff y col. (1984), quienes utilizaron el método de siembra sucesiva, donde realizaron varias etapas de polimerización y en cada una de ellas se conseguía aumentar el diámetro de partícula. Otros intentos fueron llevados a cabo por Omi y col. (1994) y por Kamiyama y col. (1993), quienes utilizaron polimerizaciones en suspensión modificadas, y por Okubo y col. (1991) que desarrollaron el método de hinchazón dinámica de monómero (DSM, del inglés “Dynamic Monomer Swelling Method”). En las polimerizaciones en suspensión modificadas, las fases de monómero y de agua se mantuvieron en recipientes separados y se alimentaron a un ritmo preciso hacia un dispersor mecánico, donde se formaron gotas pequeñas y uniformes de monómero. Luego se alimentó el reactor de polimerización con estas gotas y se llevó a cabo la polimerización. El tamaño de las partículas polimerizadas fue controlado de manera efectiva mediante el ajuste de la velocidad del dispersor. En el caso de DSM, los autores tomaron una siembra de PS y la dispersaron en un medio que contenía St, peróxido de benzoilo (BPO) como iniciador y poli(vinil alcohol) como estabilizador. Luego, agregaron lentamente (gota a gota) agua, y las partículas de PS sembradas se hincharon con el St disuelto, manteniendo la monodispersidad de la siembra.

La polimerización en dispersión es una alternativa atractiva y prometedora para obtener partículas monodispersas de tamaño micrométrico en una sola etapa de polimerización. La polimerización en dispersión puede definirse como un tipo de polimerización por precipitación, en el que se lleva a cabo la polimerización de un monómero en presencia de un estabilizador polimérico adecuado soluble en el medio de reacción. El disolvente seleccionado como medio de reacción es buen solvente tanto

para el monómero como para los polímeros estabilizadores estéricos, pero no es capaz de disolver al polímero que se está formando.

Los componentes fundamentales en este tipo de polimerizaciones son: i) el medio de dispersión, ii) los monómeros, iii) el estabilizador estérico, y iv) el iniciador.

i) Medio de dispersión: debe cumplir las características mencionadas anteriormente, de disolver a todos los componentes cuando la polimerización no ha comenzado, para que exista una única fase homogénea inicial. Los medios más empleados son alcohólicos, como etanol o metanol, y soluciones hidroalcohólicas, donde se varían las proporciones del alcohol y del agua para obtener distintos resultados.

ii) Monómeros: en este tipo de polimerizaciones los monómeros a emplear deben ser solubles en el medio de dispersión.

iii) Estabilizador estérico: juega un papel crucial en el proceso de polimerización. Ya sea que se adsorba o se incorpore en forma de injerto a la superficie del polímero recién formado, actuará como un estabilizante estérico que además tendrá influencia sobre el tamaño de partícula y sobre la estabilidad coloidal del sistema. Dado que las moléculas estabilizadoras se encuentran en la interfaz entre la superficie de las partículas sólidas y el medio de dispersión, se requiere que posean una naturaleza anfipática. Algunos ejemplos de estabilizadores estéricos empleados son: poli (vinil pirrolidona) (PVP), hidroxipropil celulosa, poli (ácido acrílico), poli (acrilamida) y poli (glutaraldehído).

iv) Iniciador: naturalmente, los iniciadores empleados son aquellos solubles en el medio de dispersión. Para el caso de alcoholes o mezclas de ellos, se puede mencionar al 2,2'-azo-bis-isobutirilnitrilo (AIBN) y al BPO.

La polimerización en dispersión comienza a partir de una fase homogénea, donde los reactivos se disuelven completamente en el medio de reacción. Cuando se generan radicales libres por descomposición del iniciador, éstos reaccionan con el monómero y empiezan a formarse radicales oligoméricos de polímeros, cuya solubilidad en el medio disminuye por el crecimiento de estos últimos. La separación de fases se produce cuando el polímero formado precipita fuera del medio, en el que es insoluble, para formar partículas inestables de polímero. Estas partículas van coalesciendo entre sí hasta un punto crítico (θ_{crit}) donde son estabilizadas por el estabilizador estérico

(Kawaguchi e Ito, 2005). Debido a este complejo cambio de fase durante la polimerización, el mecanismo de nucleación de partículas y de polimerización no ha sido aún bien entendido. Sin embargo, se sabe que las moléculas del estabilizador desempeñan un papel crucial para brindar suficiente estabilidad coloidal en la formación de partículas, evitando la coagulación entre las mismas (Hong y col. 2007). Luego de θ_{crit} , no hay nuevos núcleos y las partículas pueden crecer tanto por la captura difusiva de oligómeros y la coagulación de muy pequeñas partículas inestables producidas en la fase continua; como por la polimerización del monómero dentro de las partículas. En la Fig. 1.5 se presenta un esquema de la polimerización en dispersión.

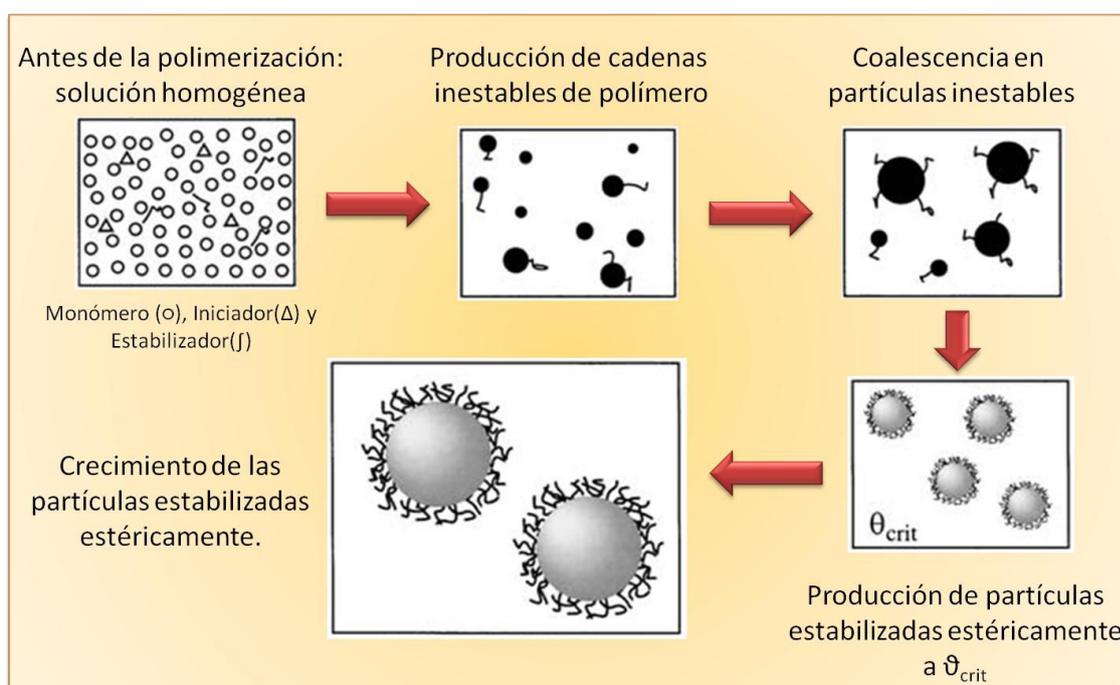


Fig. 1.5. Esquema del proceso de polimerización en dispersión.

1.3.3. Síntesis de Partículas Funcionalizadas

Las características finales y las aplicaciones de los látex dependen, entre otros factores ya mencionados anteriormente como la PSD o la monodispersidad del sistema, de la microestructura y morfología de las partículas. Existen varios tipos de partículas, con variadas características, que le confieren diferentes propiedades al producto final

(Fig. 1.6). Así, en el caso de morfologías externas esféricas, se puede tener micro/nanopartículas lisas (o compactas), porosas, cápsulas, microgeles, peludas o “hairy” (presentan cadenas flexibles en su superficie), con morfología “core-shell” y funcionalizadas (o reactivas), que permiten controlar el balance hidrofílico-hidrofóbico en la interfaz agua-polímero y también permiten la UC de diversas biomoléculas a través de los grupos reactivos. Además, las partículas pueden estar compuestas por materiales orgánicos e inorgánicos, dando lugar a “composites” o partículas híbridas (Gonzalez, 2004; Pichot, 2004; Pichot y Delair, 2005). En algunos casos, se puede tener partículas que posean varias de estas características combinadas, como por ejemplo partículas tipo “core-shell”, que a su vez sean “hairy” y presenten funcionalidad química (reactivas).

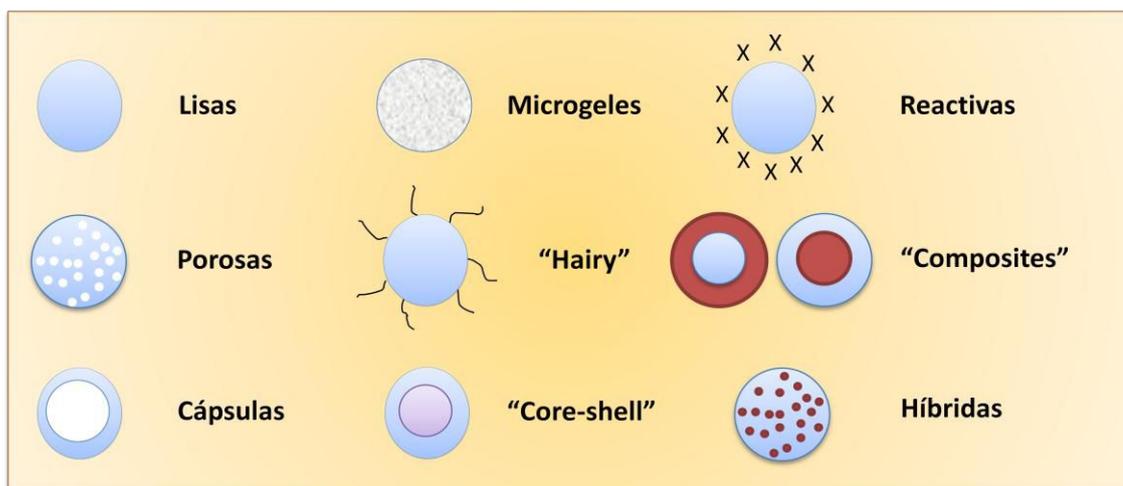


Fig. 1.6. Algunas de las posibles estructuras y morfologías de las partículas de látex.

Existen diferentes métodos que permiten producir partículas funcionalizadas, siendo uno de ellos la polimerización en emulsión de monómeros funcionales sobre partículas de látex (siembras) para la producción de partículas con morfología “core-shell”. Se trata de un proceso de polimerización en 2 etapas, donde en cada etapa se pueden controlar distintas variables. En la primera generalmente se sintetizan partículas de poliestireno (PS) y el objetivo de este paso es el control del tamaño de partícula y de la PSD. En la siguiente etapa, las partículas de PS previamente obtenidas se emplean como siembra en co-polimerizaciones que involucran a uno o varios monómeros. Generalmente se emplea una mezcla de St con uno o más monómeros funcionales.

En esta segunda etapa se pretende introducir una funcionalidad superficial específica a las partículas, sin que el tamaño se modifique significativamente.

La polimerización en emulsión sembrada es un método útil para producir partículas monodispersas en tamaño, con control de la morfología, tamaño y densidad de carga superficial de las mismas. En las polimerizaciones sembradas, el látex de siembra pre-sintetizado se utiliza para controlar, además del tamaño, el número de partículas presentes en el látex final. Además, se debe evitar la nucleación secundaria (de nuevas partículas) porque se verían afectadas las principales propiedades del látex.

Las partículas con morfología “core-shell” tienen una variada posibilidad de aplicaciones y resultan de gran interés en diversos campos, como en biomedicina. Son útiles en una amplia gama de aplicaciones, porque poseen mejores propiedades físicas y químicas respecto de las partículas formadas por un único componente. Además, resultan perfectos sistemas modelo 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.

Entre las aplicaciones biomédicas de este tipo de partículas podemos mencionar su utilización como soportes en inmunoensayos, liberación controlada de drogas, y separaciones de células sanguíneas o de diversos componentes biológicos. 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 y col., 1990; Charleux y col., 1992; Slomkowski y col., 2002); ii) carboxilo (Bahadur y col., 1985; Bastos y col., 1995; Gonzalez y col., 2008b; Golchin y col., 2012; Medina y col., 2012; Moraveji y col., 2012; Garcia y col., 2013); iii) acetal (Kapmeyer y col., 1988; Kapmeyer, 1991; Peula y col., 1995; Santos y Forcada, 1996; Bucsí y col., 1998; Miraballes y Forcada 2000; Gibanel y col., 2001; Miraballes y col., 2001; Santos y Forcada, 2001; Sanz-Izquierdo y col., 2004; Garcia y col., 2013); iv) hidroxilo (Okubo y col., 1987); v) amino (Delair y col., 1994; Ramos y col., 2003; Sanz-Izquierdo y col., 2004); vi) clorometilo (Suen y Morawetz, 1985; Sarobe y col., 1996; Sarobe y col., 1998; Sanz-Izquierdo y col., 2004) y vii) epoxi (Maehara y col., 1987).

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

En otros casos, como por ejemplo en látex con grupos clorometilo (-CH₂Cl) o epoxi (-C₂H₃O), el acoplamiento covalente se ve simplificado ya que no se requiere activación previa de los grupos funcionales, y la reacción de acoplamiento ocurre espontáneamente. En particular, los grupos epoxi presentan la ventaja de formar enlaces muy estables con diferentes grupos (amino, tiol, y fenol) de las proteínas y permiten una fácil inmovilización de biomoléculas, tanto a escala de laboratorio como industrial, donde la activación de otros grupos funcionales, cuyos activadores muchas veces suelen ser sustancias peligrosas, es indeseable (Mateo y col., 2002, 2003).

1.4. LIMPIEZA Y CARACTERIZACIÓN DE LOS LÁTEX

1.4.1. Métodos de Limpieza

Como consecuencia de la polimerización, las partículas de látex sintetizadas se encuentran contaminadas con restos de monómero e iniciador no reaccionados, emulsificantes, cadenas de oligómeros que se puedan haber formado durante la reacción y demás reactivos. Antes de continuar con el proceso de caracterización, los látex deben ser purificados para evitar que los contaminantes puedan sufrir alteraciones químicas posteriores, interactuar con la superficie, interferir en el ensayo inmunológico y disminuir la unión de proteínas.

Existen varias técnicas para realizar la purificación de las partículas de látex. Se debe tener en cuenta que el proceso de limpieza debe eliminar las impurezas, sin afectar la naturaleza y estabilidad del látex (morfología y tamaño de partícula, concentración de grupos funcionales superficiales y/o modificación química de esos grupos). Si las partículas de látex están químicamente estabilizadas por grupos cargados, éstos son claramente una parte integral de las partículas y el proceso de limpieza no debe quitarlos o modificarlos. En algunos casos, las partículas de látex están estabilizadas por

emulsificantes, y la eliminación de éstos mediante la limpieza, puede dar lugar a la inestabilidad y a la agregación de las partículas. Es preciso, además, evitar la introducción de nuevas impurezas que puedan estar presentes en el equipo, materiales y/o en el agua utilizada para la limpieza, así como también la posible contaminación con bacterias y hongos. Estos factores deben considerarse también a la hora de almacenar las partículas.

Teniendo en cuenta que ninguna técnica, por sí sola, es capaz de eliminar todas las impurezas, a continuación analizaremos las ventajas y desventajas de diferentes procedimientos de limpieza.

El método de desplazamiento de suero (o “serum replacement”) se basa en el reemplazo de la fase acuosa, medio de dispersión o “serum” del látex con agua destilada y deionizada (Ahmed y col., 1980; El-Aasser y col., 1980; Daniels y col., 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 permite el paso de las impurezas de tamaños menores y disueltas en el agua. El látex se lava continuamente hasta que la conductividad del eluyente iguale a la del agua de alimentación (Fig. 1.7.). Como el flujo de alimentación es perpendicular a la superficie de la membrana, las ventajas del aumento de la presión se pueden ver reducidas por la obstrucción de los poros debido a la acumulación de una capa superficial de partículas sobre la membrana, que puede producir 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, efectiva, y puede emplearse también para concentrar un látex. 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 y col., 1980). Además, se puede emplear una variedad de filtros de diferentes tamaños de poro y composición, y la fase acuosa se puede recuperar para su análisis.

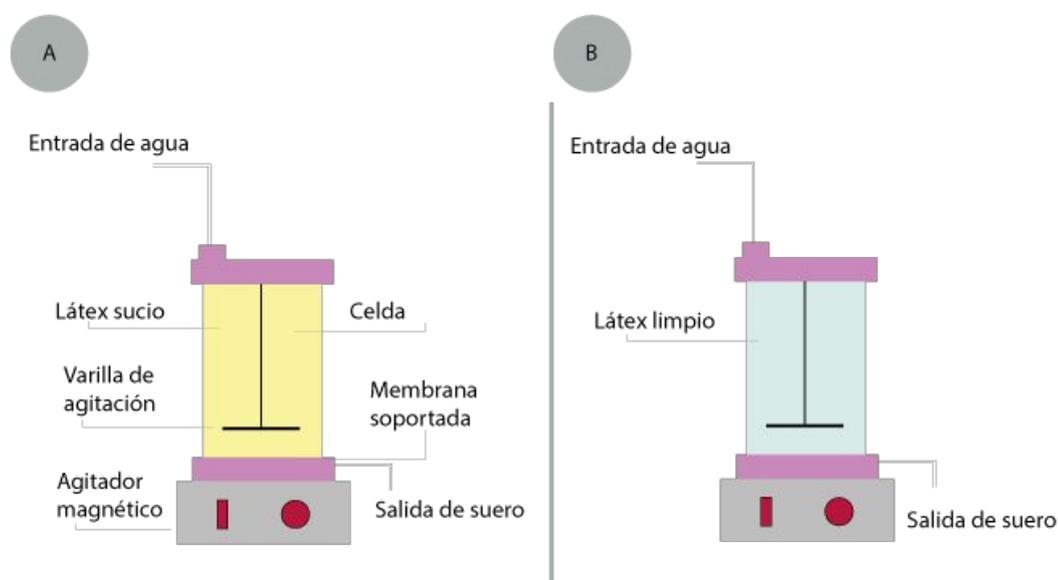


Fig. 1.7. Esquema del dispositivo empleado en la purificación de los látex por desplazamiento de suero, antes (a) y después (b) del proceso de limpieza.

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. El sobrenadante se elimina o conserva para su análisis y las partículas se resuspenden en agua ultrapura. La operación de centrifugación 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. Si bien la técnica es tediosa y algunos látex pueden perder la estabilidad, generando agregación irreversible, el tiempo necesario para limpiar un determinado látex es menor que el requerido para su limpieza por desplazamiento de suero.

Otra técnica de lavado que no se utilizará en esta Tesis, pero que es también de uso habitual, es la diálisis. En esta técnica, el látex se introduce en membranas porosas (normalmente de celulosa regenerada) y estas se sumergen en agua ultrapura con una proporción de agua aproximadamente 20 veces mayor al contenido del látex. Con esta técnica, el proceso de limpieza resulta más largo y dificultoso, pudiéndose demorar hasta 3 o 4 semanas.

1.4.2. Caracterización Morfológica y Superficial

Es importante pensar en la aplicación de los látex a la hora de diseñar su síntesis. Para la aplicación de interés en esta Tesis, los látex deben cumplir ciertos requisitos en lo que refiere a su: i) monodispersidad de tamaños de partícula; ii) composición; iii) densidad de carga superficial; iv) densidad de grupos funcionales y v) estabilidad coloidal. El tamaño de partícula es fundamental para el funcionamiento adecuado de un inmunoensayo. Para un dado contenido de sólidos, 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 específica menor. La monodispersidad de la PSD permite controlar la superficie disponible y garantizar reproducibilidad. La composición monomérica 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. La densidad de carga superficial y la densidad y tipo de grupos funcionales, tienen influencia sobre la estabilidad del látex y sobre la capacidad de acoplamiento de biomoléculas. La estabilidad coloidal de los látex es importante ya que se requiere que el sistema se mantenga estable en el medio donde se llevará a cabo el inmunoensayo.

1.4.2.1. Caracterización de Tamaños de Partícula

El control del tamaño de partícula y de la monodispersidad de la PSD es un requerimiento muy importante para predecir el comportamiento de los látex, 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 los objetivos se enfocan a que la PSD sea lo más angosta posible. Se pueden utilizar diferentes técnicas para determinar el tamaño de partícula, presentando cada una un conjunto de ventajas y limitaciones.

La microscopía electrónica (ME), en sus versiones de transmisión (TEM, del inglés “Transmission Electron Microscopy”) y de barrido (SEM, del inglés “Scanning Electron Microscopy”), es la técnica de observación directa más poderosa para la medición de tamaños de partícula. Sin embargo, presenta problemas de representatividad, 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 DLS permite determinar tamaños medios de partícula en forma simple, rápida y confiable. 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. En DLS, una luz láser (monocromática) incide sobre una muestra de látex diluida, y un fotómetro colocado a un ángulo fijo θ_r 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. 1.8).

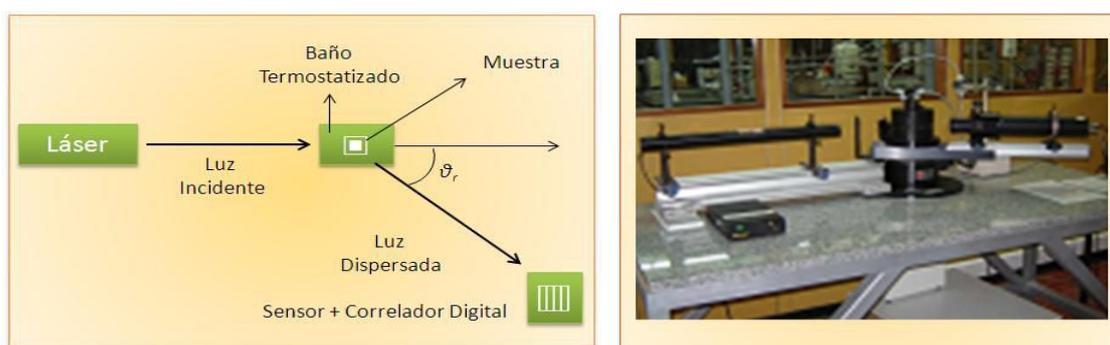


Fig. 1.8. Esquema y foto del equipo de dispersión de luz dinámica utilizado.

El movimiento de las partículas está esencialmente controlado por la temperatura de medición, la viscosidad del medio y su tamaño. 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 tanto a la partícula como a la capa de hidratación que la rodea.

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

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

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 PSD como monodispersa, la función de autocorrelación se puede ajustar mediante:

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

con:

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

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 el coeficiente de difusión traslacional d_T y la norma del vector de onda q_r :

$$\Gamma_r = d_T q_r^2 \quad (\text{Ec. 1.4})$$

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

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

donde k_B es la constante de Boltzmann; T_0 es la temperatura de medición 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} según:

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

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 D , 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 ± 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 PSD, no existiendo solución única al problema (Gugliotta y Vega, 2010). Esto puede solucionarse en parte empleando la técnica de DLS a múltiples ángulos de medición (MDLS), que permite obtener estimaciones de la PSD más confiables (Clementi, 2012). Además, por MDLS se puede obtener información sobre la monodispersidad del sistema coloidal en base a que, para un látex estrictamente monodisperso, el D_{DLS} es independiente del ángulo de medición. Por lo tanto, la variación del D_{DLS} cuando se lo determina a distintos ángulos de medición, es indicativa de la falta de monodispersidad del sistema coloidal.

1.4.2.2. 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, de emulsificantes o por disociación de grupos superficiales ionizables del polímero, provenientes del iniciador y/o 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 una solución valorante. Típicamente, existen dos casos posibles: i) valoración de ácido fuerte y ii) valoración de ácido débil.

En el caso de una dispersión de partículas con grupos ácido fuerte valorada con una solución de NaOH, inicialmente la conductividad es grande porque el grupo ácido está totalmente disociado y los iones H^+ tienen una movilidad muy alta. Conforme se van agregando iones OH^- provenientes de la solución valorante, se van neutralizando

los iones H^+ de la muestra y 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, se obtienen dos rectas con diferentes pendientes, 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 (Fig. 1.9).

En el caso de una dispersión de partículas con grupos ácido débil, inicialmente la ionización es muy pequeña, por lo que la conductividad es baja ya que hay pocos iones H^+ . 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. 1.9).

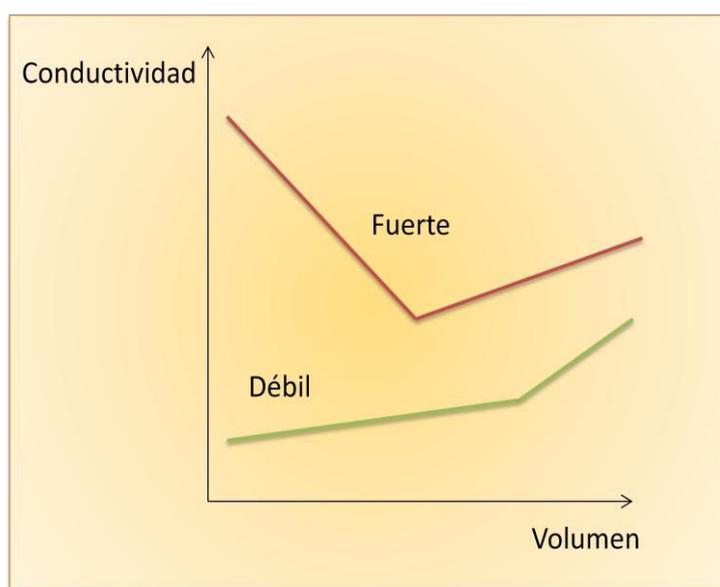


Fig. 1.9. Curvas típicas de valoración conductimétrica para una dispersión de partículas con grupos ácido fuerte y ácido débil.

Otro método también empleado para determinar la densidad de carga o de grupos funcionales es la valoración potenciométrica. Consiste en la determinación del potencial eléctrico (respecto a uno de referencia) de la disolución y su evolución frente al agregado de la solución valorante. Para determinar el potencial se emplea un electrodo selectivo al analito que se desea determinar y el voltaje que se mide es representativo de

la concentración de la especie en solución. Uno de los electrodos más empleados es el de pH, con el objetivo de determinar la concentración de iones H^+ . Cuando se representa la evolución del voltaje (o del pH) en función de la cantidad de valorante agregado se obtiene una función con uno o más puntos de inflexión (Fig. 1.10). Estos puntos de inflexión son los puntos de equivalencia de las distintas especies que se están valorando y se pueden determinar con precisión calculando la primera derivada. Así, se observa la presencia de valores máximos correspondientes a los puntos de equivalencia. Cuando se produce la neutralización entre un ácido fuerte y una base fuerte, el pH en el punto de equivalencia es 7 (y el voltaje 0), ya que todos los iones se neutralizaron. En otros casos, cuando la especie que se está determinando es un ácido o base débil, el pH en el punto de equivalencia es mayor o menor que 7 (dependiendo el caso) debido a la hidrólisis que sufre el anión del ácido débil o el catión de la base débil.

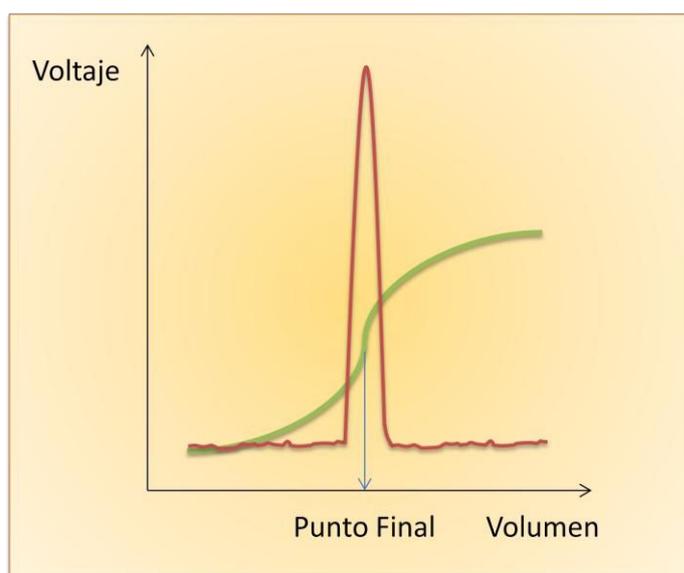


Fig. 1.10. Curva típica de valoración potenciométrica (verde) y 1ª derivada (rojo).

Otra de las características fundamentales de los látex es la estabilidad del sistema coloidal, es decir, la capacidad de las partículas de permanecer como entidades aisladas en el medio que las rodea durante largos períodos de tiempo. En general, las partículas coloidales dispersas en un medio 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 incremento 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. 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), provenientes del iniciador, de los monómeros o de estabilizadores empleados en la polimerización. La combinación de estos dos mecanismos se conoce como estabilización electroestérica (Napper, 1983; Stenkamp y Berg, 1997; Peula y col., 1998; Forcada e Hidalgo, 2005).

La estabilización electrostática puede ser proporcionada durante la síntesis del látex, utilizando iniciadores cuya descomposición genere cargas iónicas (sales de persulfato, algunos azo-derivados) y comonómeros iónicamente cargados, aumentando significativamente, en ambos casos, la densidad de carga superficial.

La estabilización estérica está vinculada con la longitud de las capas de moléculas adsorbidas o ancladas. Si éstas son muy delgadas, entonces las partículas podrán aproximarse entre sí hasta que las fuerzas de atracción sean suficientes para producir el contacto. Por el contrario, cuanto mayor sea el espesor de las capas de moléculas, menor será la probabilidad de contacto entre las partículas y mayor la estabilidad del sistema coloidal.

Los factores que influyen directamente en la estabilidad coloidal son: el tamaño de las partículas poliméricas, la naturaleza de los grupos superficiales, la densidad de carga superficial, el pH y la FI del medio. El tamaño, 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 y de la naturaleza de sus grupos funcionales superficiales, puede variar la

densidad de carga superficial, afectando la estabilidad coloidal del sistema. Además, la FI del medio influye sobre las cadenas flexibles de oligómeros adsorbidas o ancladas sobre la superficie. Si estas cadenas presentan grupos iónicos, a baja FI las mismas se encuentran extendidas hacia la disolución debido a la repulsión electrostática existente entre los grupos cargados. Al aumentar la FI, se produce un apantallamiento de los grupos iónicos de las cadenas y disminuye la repulsión electrostática entre las mismas. Así, las cadenas se colapsan sobre la superficie de la partícula y la estabilidad del sistema disminuye debido a que se pierde la estabilización estérica proporcionada por las mismas.

La estabilidad de los sistemas coloidales puede estudiarse por diferentes vías. Por un lado, puede determinarse la capacidad del sistema de permanecer estable frente al agregado de un electrolito, mediante la determinación de la concentración crítica de coagulación (c.c.c.). Por este método se analiza la respuesta del látex frente al aumento de la FI del medio, a través del agregado de una sal, lo que inestabiliza al sistema. La c.c.c. 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 determinación, se utilizan métodos instrumentales basados en mediciones de dispersión de luz (DLS, turbidimetría y nefelometría).

Por otro lado, la estabilidad puede estudiarse mediante la evaluación electrocinética del sistema. Cuando una partícula coloidal cargada se encuentra en una disolución de electrolito, los iones de signo contrario a la carga de la partícula (contraiones) tenderán a orientarse alrededor de ésta, de forma de contrarrestar el exceso de carga y mantener la electroneutralidad de la disolución. A la disposición de la carga eléctrica en la partícula y el balance de cargas en la disolución se la denomina doble capa eléctrica (Fig. 1.11).

La capa de líquido que rodea a la partícula puede diferenciarse en dos zonas: i) una capa rígida, capa de Stern, constituida por cargas de signo opuesto a las partículas, adsorbidas a la superficie de las mismas y ii) una capa difusa de Gouy-Chapman, constituida por el resto de los iones móviles, hasta el límite neutro del medio. Cuando una partícula se mueve, algunos iones de la capa difusa continúan unidos a la misma pero otros iones más lejanos no viajan con la partícula. Este límite es llamado

plano de deslizamiento. El potencial que existe en este límite se conoce como el potencial Zeta (ζ).

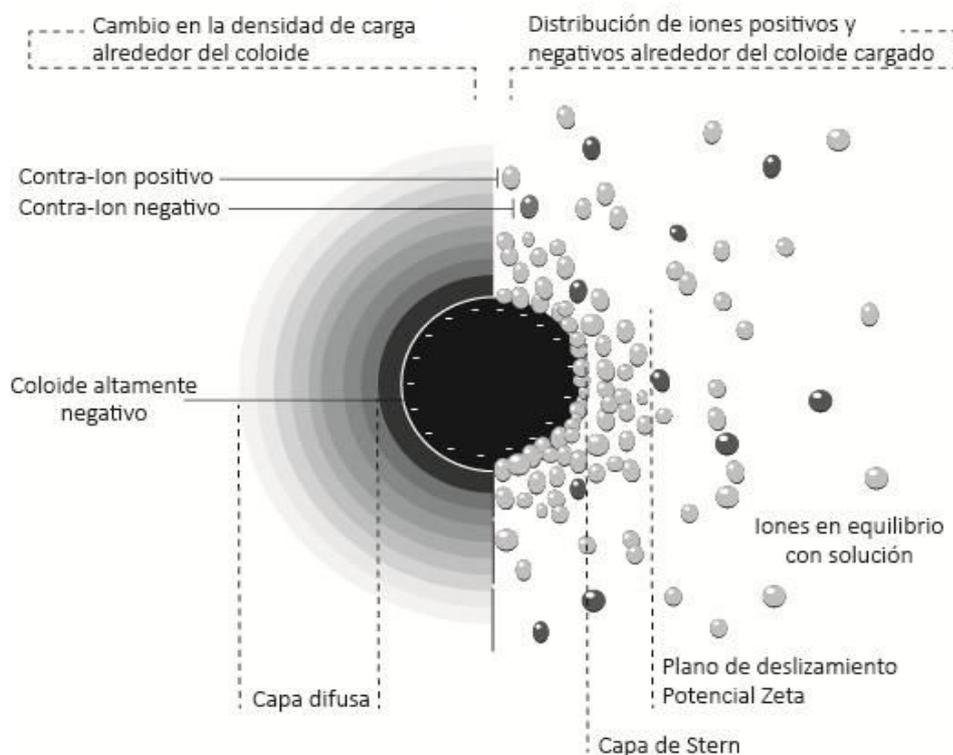


Fig. 1.11. Esquema de la doble capa eléctrica de una partícula cargada negativamente.

Una consecuencia importante de la existencia de la doble capa eléctrica es que se pueden estudiar los efectos que exhibe la partícula ante la aplicación de un campo eléctrico. Estos se definen colectivamente como efectos electrocinéticos. Hay cuatro efectos distintos, dependiendo de la manera en la que se induce el movimiento: i) electroforesis, es el movimiento de una partícula cargada en relación con el líquido en que está suspendida; ii) electroósmosis, es el movimiento de un líquido con relación a una superficie cargada estacionaria; iii) potencial de flujo (“streaming”), es el campo eléctrico generado cuando un líquido es forzado a fluir más allá de una superficie cargada estacionaria; y iv) potencial de sedimentación, es el campo eléctrico generado cuando las partículas cargadas se mueven con relación a un líquido estacionario.

En la electroforesis, las partículas cargadas suspendidas en el medio son atraídas hacia el electrodo de carga opuesta. Las fuerzas viscosas propias del medio en que se

encuentran tienden a oponerse a este movimiento. Cuando se alcanza el equilibrio entre estas dos fuerzas opuestas, las partículas se mueven con velocidad constante. La velocidad de una partícula bajo la influencia de un campo eléctrico se conoce como movilidad electroforética (μ_e) y depende de los siguientes factores: i) la fuerza del campo eléctrico o gradiente de voltaje, ii) la constante dieléctrica del medio, iii) la viscosidad del medio; y iv) el ζ .

A partir de la determinación de μ_e se puede calcular ζ mediante la aplicación de la ecuación de Henry:

$$\mu_e = \frac{2 \varepsilon \zeta}{3\eta} f(ka) \quad (\text{Ec. 1.7})$$

donde ε es la constante dieléctrica del medio y $f(ka)$ es un factor correctivo relacionado con el radio de la partícula k , y el espesor de la doble capa eléctrica, a ; y puede tomar valores entre 1,0 y 1,5.

La μ_e debe ser interpretada en términos de la carga efectiva de las partículas, la cual es diferente a la densidad de carga superficial medida por titulación conductimétrica. Mientras que la densidad de carga superficial brinda información sobre el tipo de grupos (fuertes o débiles) presentes en la superficie de las partículas y su cantidad por unidad de área; el estudio de los parámetros electrocinéticos (μ_e y ζ) provee información sobre el comportamiento de la doble capa eléctrica de las partículas coloidales y su interacción con el medio que las rodea.

1.5. PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS UTILIZADAS

La mayoría de los métodos serológicos para el diagnóstico de la Toxoplasmosis están basados en el uso de proteínas del extracto completo del *T. gondii*, obtenidas a partir de cultivos del parásito en ratones. Este extracto se denomina homogenato y su

composición es compleja, indefinida y variable. En consecuencia, aparecen dificultades para estandarizar las metodologías que lo emplean y existe considerable variación en la reproducibilidad y exactitud de los resultados obtenidos.

Como alternativa, los Ag recombinantes del *T. gondii* constituyen una herramienta valiosa para su uso como elemento de reconocimiento en los métodos serológicos para el diagnóstico de la Toxoplasmosis, ya que pueden ser producidos con alta pureza y calidad estandarizada. La sustitución de los Ag nativos por Ag recombinantes del *T. gondii* en inmunoensayos ha demostrado ser de gran utilidad para estandarizar los métodos diagnósticos y reducir sus costos (Pietkiewicz y col., 2004).

Varias proteínas recombinantes del *T. gondii* han sido expresadas y probadas como Ag mediante ensayos de ELISA (Parmley y col., 1992; Van Gelder y col., 1993; Redlich y Muller, 1998; Aubert y col., 2000; Suzuki y col., 2000; Li y col., 2000; Kimbita y col., 2001; Sager y col., 2003; Nigro y col., 2003; Pietkiewicz y col., 2004; Martin y col., 2004; Clemente y col., 2005; Hiszczyńska-Sawicka y col., 2005; Cóceres y col., 2010; Jalallou y col., 2010; Chong y col., 2011; Costa, 2014). En particular, algunos Ag, como los denominados Gra4, Gra6, Gra7, P35, P22, P25 y P29, evaluados individualmente o en combinaciones entre sí, han mostrado ser buenos candidatos para discriminar Ac de fase aguda y podrían ser útiles para el desarrollo de kits diagnósticos con el objetivo de detectar la Toxoplasmosis recientemente adquirida.

1.5.1. Síntesis de Proteínas Recombinantes

1.5.1.1 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 sinteticen una proteína que le sea totalmente extraña, denominada proteína heteróloga o recombinante. La bacteria *Escherichia coli* es el microorganismo más empleado como

hospedador del ADN recombinante 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. 1.12, se pueden resumir en cuatro (Sambrook y col., 1989; Alberts y col., 1996; Izquierdo Rojo, 2001, Snyder y Champness, 2003):

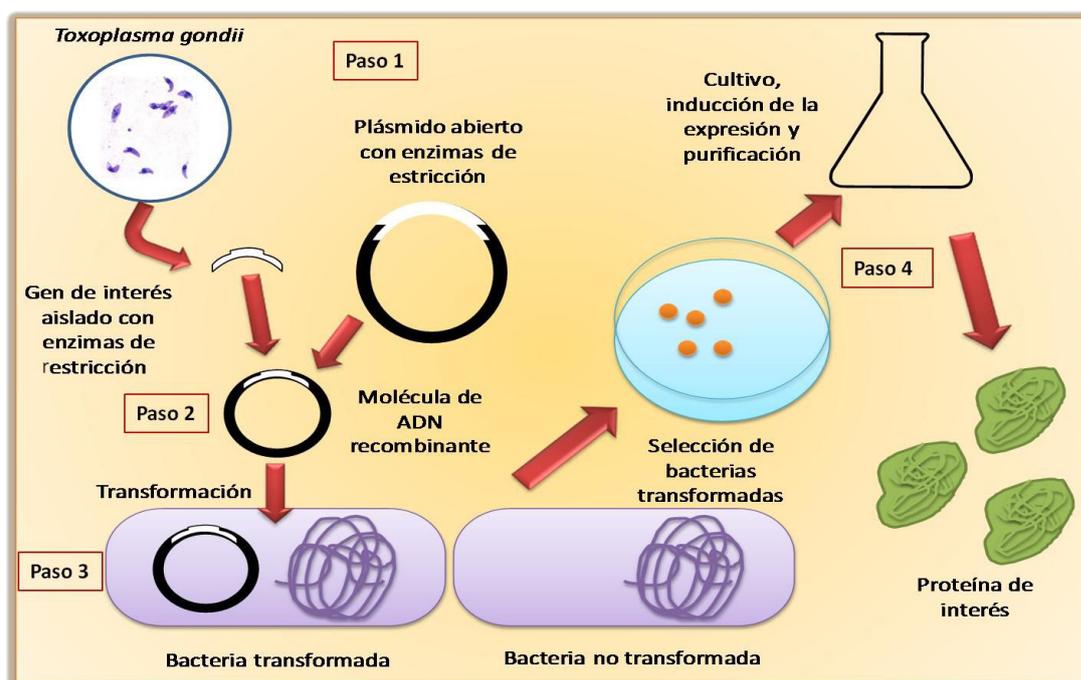


Fig. 1.12. Esquema de los pasos a seguir para obtener una proteína recombinante.

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 Nathans y 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 mediante un proceso llamado transformación. Estos métodos no son totalmente efectivos por lo que algunas células huéspedes incorporarán el plásmido recombinante y otras no. Una forma de identificar las bacterias que contienen el gen de interés, es utilizando plásmidos que transporten genes que generen resistencia a antibióticos. Cuando estas bacterias son colocadas en un medio de cultivo sólido conteniendo el antibiótico, la bacteria que adquirió el plásmido recombinante crecerá en colonias, pero aquellas que no lo hicieron no podrán desarrollarse en ese medio. Cada colonia es llamada un clon. 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.

Paso 4: A partir de una colonia que contiene el gen de interés se hace un cultivo en medio líquido para amplificar la cantidad de células huéspedes. En un determinado momento del crecimiento bacteriano se induce la expresión del gen de interés. Luego se procede al aislamiento de la proteína recombinante. El primer paso es la rotura celular que da por resultado un lisado u homogenato que contiene una mezcla de proteínas, enzimas, membranas y restos celulares. Esta preparación se somete a centrifugación para eliminar los componentes insolubles y separar el sobrenadante, que contiene las proteínas solubles. 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 utilizados para la separación de proteínas es la cromatografía en columna de afinidad. 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. El principio de separación suele ser la afinidad de la proteína recombinante hacia iones metálicos unidos a agentes quelantes inmovilizados en la fase estacionaria. Durante el clonado del gen recombinante se añade una secuencia repetitiva del aminoácido histidina, que presenta gran afinidad por el ión Níquel. Una vez que toda la muestra atravesó la columna y que la proteína de interés quedó retenida, se procede a su elución con un compuesto que también presenta afinidad hacia el metal inmovilizado, compitiendo con la proteína. Un colector de fracciones va recogiendo el eluyente y 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.

1.5.1.2 Ventajas del Uso de Proteínas Recombinantes

Cuando se utiliza una mezcla compleja de Ag, como el homogenato del parásito, donde una gran parte son Ag indefinidos, no sólo aparecen problemas de especificidad, sino también dificultades para estandarizar la calidad de los reactivos que lo utilizan. En el caso del *T. gondii*, comparado con otro tipo de microorganismos, su cultivo es muy difícil y generalmente con malos rendimientos. Las proteínas recombinantes, además de que pueden ser obtenidas en buenas cantidades y de forma altamente purificada, pueden ser sintetizadas a partir de secuencias de ADN diseñadas específicamente para codificar fragmentos peptídicos altamente antigénicos, lo cual permite mejorar el rendimiento antigénico en comparación con el homogenato total del parásito. La sustitución de los Ag nativos por Ag recombinantes del *T. gondii* en inmunoensayos, constituye una herramienta valiosa para su uso como elemento de reconocimiento en los métodos serológicos para el diagnóstico de la Toxoplasmosis.

1.5.2. 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 carboxilo ($-\text{COOH}$). En posición α también se encuentran un átomo de hidrógeno y un 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, puede alterar 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.

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 la acción de surfactantes, 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 polipeptídica, la proteína puede llegar a recuperar la conformación nativa en un proceso denominado renaturalización. En este proceso se produce nuevamente el plegamiento de la estructura

secundaria, aunque dependiendo de las condiciones del medio puede ser idéntico al original o no. 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).

1.5.3. Métodos Utilizados para la Cuantificación de Proteínas

La determinación de 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. 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 métodos utilizados para la cuantificación de proteínas empleados en esta Tesis.

1.5.3.1 Método del Acido Bicinconínico

Smith y col. (1985), introdujeron el ensayo del ácido bicinconínico (BCA). Desde entonces, se ha convertido en el método colorimétrico más popular para la detección y cuantificación de proteínas totales. Este método combina la reacción de Biuret (reacción de las proteínas con Cu^{2+} , en medio alcalino, para dar Cu^{1+}) con el ácido bicinconínico, 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. 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 $\text{BCA}/\text{Cu}^{1+}$ 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 surfactantes; es sencillo, rápido, y fácil de realizar.

1.5.3.2. Cuantificación por Fluorometría

Este método se basa en la unión específica entre el reactivo y las proteínas, de manera tal que luego de la unión la fluorescencia del reactivo se ve aumentada varios órdenes de magnitud. Para una cantidad específica de reactivo unido, la magnitud de señal de fluorescencia de esta mezcla es directamente proporcional a la concentración de proteínas en la solución. La señal de fluorescencia se recoge por un fluorómetro y, usando patrones de albúmina sérica bovina (BSA) de concentración conocida, se determina la concentración de proteínas de la muestra. Una ventaja de este método es la poca cantidad de muestra (1-20 μL) necesaria para cuantificar proteínas con adecuada sensibilidad.

1.5.3.3. Cuantificación por Absorbancia

Uno de los métodos más sencillos y simples para la determinación de proteínas es la medición de la A de la muestra. Las soluciones de proteínas absorben en la región de la radiación ultravioleta (UV), siendo la A más significativa la de los aminoácidos triptofano y tirosina a 280 nm. De esta manera, siempre que la proteína en estudio presente estos aminoácidos en su estructura, será posible cuantificarla mediante A a 280 nm. Para ello, se debe contar con una curva de calibrado, normalmente de BSA. Los inconvenientes de esta técnica son que los coeficientes de extinción varían de acuerdo a la proteína, muchas sustancias no proteicas causan interferencias ya que

absorben fuertemente en la región del UV y como se dijo antes, no es aplicable a todos los tipos de muestra.

1.5.3.4. Cuantificación por Geles de Poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida permite separar proteínas en base a sus PM. Luego, las proteínas pueden colorearse y la intensidad del color resulta proporcional a la cantidad de proteína sembrada en el gel. La cuantificación de las proteínas obtenidas frente a una curva de calibrado de BSA se realiza mediante el análisis de las imágenes de geles de poliacrilamida, utilizando un software que permite medir y automatizar los procesos de obtención de datos en distintos tipos de geles, relacionando la intensidad de la imagen con la concentración de la proteína sembrada.

1.6. SENSIBILIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS DE LÁTEX

Una vez sintetizados y caracterizados los látex funcionalizados y las proteínas antigénicas, el paso siguiente para la obtención de reactivos de IA es la sensibilización de las partículas con los Ag de interés. Este procedimiento puede realizarse por simple AF, que involucra interacciones hidrofóbicas, de Van der Waals, electrostáticas y/o puentes de hidrógeno; o por UC, en la cual los grupos funcionales de las partículas reaccionan con determinados grupos presentes en las proteínas. Singer y Plotz (1956) fueron los pioneros en la unión de proteínas a la superficie de partículas de coloides poliméricos, adsorbiéndolas físicamente sobre partículas de PS. 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 y col., 1968; Hipp y col., 1970; Heymer y col., 1973; Horwitz y col., 1973; Smith y Ts’ao, 1973; Bird y Wingham, 1977). En la actualidad, la mayoría de las investigaciones dedicadas al diagnóstico por IA se centran en la obtención de CLP mediante UC. Para conseguir este tipo de unión, es necesario sintetizar partículas de látex con una funcionalidad química superficial tal que pueda reaccionar eficazmente con las proteínas. En esta Tesis se trabajó con partículas de látex

con funcionalidades carboxilo y epoxi como soportes poliméricos para llevar a cabo la UC de distintas proteínas antigénicas. Los grupos carboxilo no reaccionan espontáneamente, y necesitan ser activados mediante el método de la carbodiimida. La interacción entre los grupos epoxi y las proteínas sí es espontánea, aunque el tiempo y la temperatura de reacción son parámetros que tienen gran influencia sobre la apertura del anillo oxirano y el acoplamiento de las biomoléculas.

1.6.1. 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 de las partículas y la actividad biológica de las biomoléculas. Las partículas de látex pueden ser sensibilizadas (recubiertas) por proteínas, tales como Ag, Ac, enzimas 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, de Van der Waals, hidrofóbicas y/o puentes hidrógeno) se denomina AF. En cambio, si se forma un enlace específico entre las moléculas y la superficie, se designa como UC. Una vez que la partícula ha sido sensibilizada, las condiciones del medio que rodea directamente a las proteínas pueden ser muy diferentes a las existentes en solución libre (efecto microambiental). Por lo tanto, se pueden producir alteraciones en la actividad biológica, debido a la desnaturalización de la proteína, cambios en la estabilidad, y modificaciones en sus propiedades cinéticas.

La AF 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, hidrofóbicas y/o 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 (Serra y col., 1992; Ortega-Vinuesa e Hidalgo-Álvarez, 1993; Norde, 1995). 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, debido a los enlaces involucrados, algunas moléculas adsorbidas físicamente pueden ser desorbidas por cambios de temperatura, pH, FI, presencia de surfactantes; las moléculas en solución pueden disociarse, reestructurarse y volver al estado nativo, o permanecer en el estado perturbado. En un reactivo para inmunodiagnóstico, la desorción de proteínas unidas físicamente implica la alteración del reactivo en el tiempo.

La UC cuenta con varias ventajas respecto de la AF. 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 AF. Sin embargo, para la UC de las proteínas sobre la superficie de las partículas, es necesario que ambas presenten grupos funcionales capaces de interactuar entre sí para formar un enlace específico.

La unión covalente se debe realizar en condiciones tales que los reactivos utilizados no causen la pérdida de la actividad de la proteína. Además, el medio de reacción no debe contener compuestos que puedan interferir en la reacción o competir con la proteína.

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. 1.13). La

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

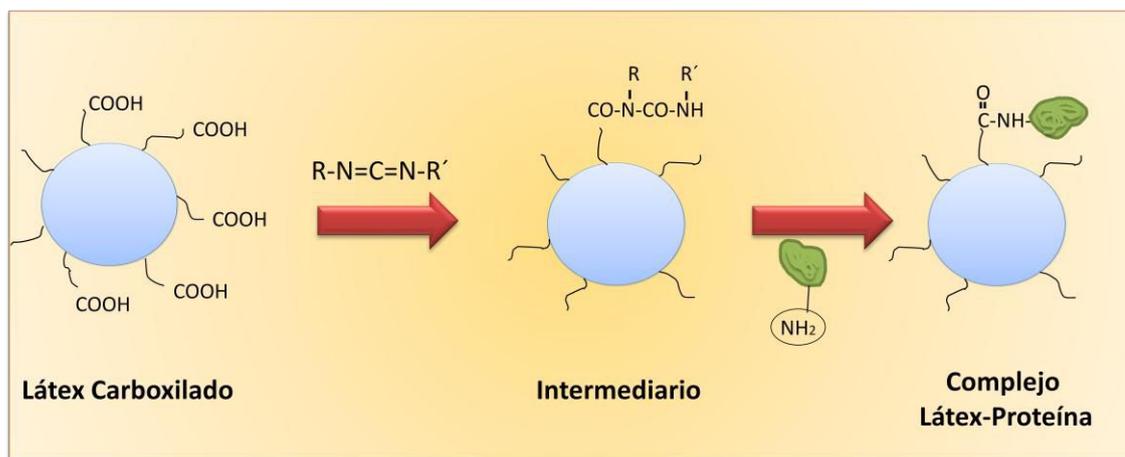


Fig. 1.13. Unión covalente entre un grupo amino y uno carboxilo, activado por una carbodiimida.

Los látex con funcionalidad epoxi no necesitan de activación previa para reaccionar. La unión covalente ocurre cuando un grupo reactivo de una proteína, como puede ser el amino (aunque también es posible con carboxilo, fenol, hidroxilo y tiol), reacciona con el grupo epoxi de la partícula de látex para formar un nuevo enlace, uniendo la proteína a la superficie del látex. Este acoplamiento usualmente ocurre a pH entre 7 y 9 (Dorman y Mani, 1980). Como se muestra en la Fig. 1.14, el acoplamiento químico sigue un mecanismo de 2 etapas: primeramente una etapa rápida donde ocurre la AF de la proteína a la superficie de la partícula; y en segundo lugar, una etapa lenta que implica la apertura del anillo oxirano para interaccionar con algún grupo funcional de la proteína (Mateo y col., 2002). Varios autores han reportado este tipo de UC bajo diferentes condiciones experimentales (Shechter y col., 1956; Dorman y Mani, 1980; Maehara y col., 1987; Mateo y col., 2002; Mateo y col., 2003). Al ser una reacción lenta, se requieren tiempos de incubación considerables, aunque los mismos pueden reducirse aumentando la temperatura. Otras variables que influyen en el acoplamiento químico son la FI del medio y los factores estéricos.

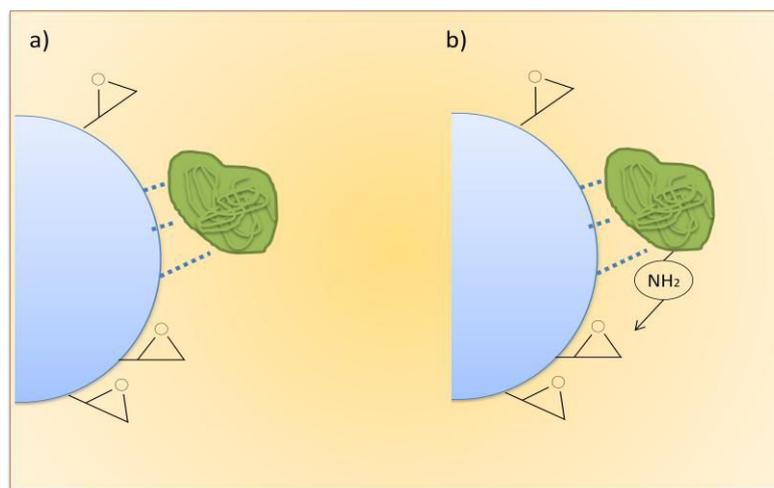


Fig. 1.14. Esquema del mecanismo de interacción entre una biomolécula y un grupo epoxi sobre la superficie de una partícula. En primer lugar ocurre la adsorción física de la proteína (a), seguido por la unión covalente con el grupo epoxi (b). Adaptado de Mateo y col., 2002.

1.6.2. Evaluación de la Antigenicidad de las Proteínas Unidas a la Superficie de las Partículas

Teniendo en cuenta los posibles cambios en la actividad biológica de las proteínas luego del proceso de acoplamiento a la superficie de las partículas de látex, es adecuado testear que la función biológica de las mismas no se haya alterado sensiblemente. En este caso, como se emplearon Ag para sensibilizar las partículas, la función biológica evaluada fue la antigenicidad, es decir la capacidad de un Ag de ser reconocido por los Ac específicos. Una forma de evaluar si el Ag sigue siendo reconocido por los Ac es mediante la técnica de ELISA.

1.7. APLICACIÓN DE LOS COMPLEJOS LÁTEX-PROTEÍNA EN ENSAYOS DE INMUNOAGLUTINACIÓN

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 (Engvall y Perlmann, 1972; Langone y Van Vunakis, 1975; Hammock y Mumma, 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 y col., 1976; Tijssen, 1985; Johnstone y Thorpe, 1982; Bloisi, 1988; Harlow y Land, 1988; Bullock y Petrusz, 1989; Wild, 1994; Lefkovits y Pernis, 1997). El Ag 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. Los Ag que contienen múltiples puntos de unión (epítopos) para los diferentes Ac presentes en el suero se denominan Ag multivalentes. Si el Ag es desnaturalizado, el epítopo puede ser alterado y esto puede afectar su actividad biológica, es decir su habilidad para interactuar con un Ac. El Ac, también conocido como inmunoglobulina (Ig), es una proteína producida como parte de la respuesta inmune del cuerpo en respuesta a una sustancia “extraña”. Estos constan de dos regiones principales: la región F_{ab} , que contiene el punto de unión del Ag y que varía entre diferentes Ac; y la región F_c , que posee una estructura constante dentro de una clase (isotipo) de Ac del organismo (Fig. 1.15).

A partir de la extracción de sangre de un individuo, se separa el suero, el cual generalmente es rico en Ac, del resto de los componentes sanguíneos. Por lo general, contiene una mezcla de Ac que reconocen y se unen a un mismo Ag, pero pueden combinarse con diferentes epitopes. A estos Ac, presentes como una mezcla diversa, se los denominan Ac policlonales y pueden variar de un individuo a otro.



Fig. 1.15. Estructura de un anticuerpo y regiones funcionales.

La afinidad describe la suma de todas las interacciones (atractivas y repulsivas) entre el sitio de unión del Ac (paratope) y el correspondiente epítope 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 epítopes.

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).

Durante los inmunoensayos pueden aparecer interferencias que afectan tanto la S como la E. 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, FI, concentración de Ag-Ac y calidad de reactivos, son parámetros claves que afectan la respuesta del inmunoensayo.

1.7.1. 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. El hecho de que la unión Ag-Ac pueda ser visualizable por los fenómenos de precipitación, aglutinación y otros mecanismos indirectos (marcaje con fluoresceína, con radioisótopos o con enzimas) hace que estos métodos se empleen ampliamente.

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

1. Técnicas de marcación con enzimas: la reacción Ag-Ac es detectada de manera indirecta mediante el empleo de un determinado Ac conjugado a una enzima. El Ac del conjugado es capaz de unirse a las regiones F_c de los Ac de la muestra que han interactuado con el Ag, y la enzima es empleada para revelar la reacción Ag-Ac.

2. *Técnicas de fluorescencia y citometría de flujo*: para la realización de estas técnicas, el Ac se marca con un fluorocromo, detectándose la formación del complejo Ag-Ac por la fluorescencia emitida bajo microscopio de luz ultravioleta.

3. *Técnicas de radioinmunoensayo (RIA)*: en estas técnicas, se une un isótopo radiactivo al Ac, 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 radioisótopos. Además de su peligrosidad y la obligatoriedad de disponer de instalaciones adecuadas para su utilización, existen radioisótopos que tienen el inconveniente de corta vida media.

4. *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.

5. *Técnicas de aglutinación y precipitación*: la reacción Ag-Ac se puede detectar y cuantificar por el aglutinado o precipitado formado. La 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 particulado, es decir unido o formando parte de células, bacterias o partículas.

En los ensayos de aglutinación se pueden utilizar partículas de látex como soporte para la fijación de Ag (o Ac), de manera tal de detectar Ac (o Ag) específicos y amplificar la reacción Ag-Ac que se produce en el inmunoensayo. Este método resulta rápido, es de sencilla realización e interpretación, presenta relativamente alta S analítica y es especialmente útil en aquellos laboratorios con escaso personal y equipamiento. Las ventajas enumeradas hacen de las reacciones de aglutinación una valiosa herramienta para la búsqueda de Ac específicos contra agentes patógenos en estudios de tamizajes donde se debe analizar un gran número de muestras.

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. 1.16). En un extremo de la curva, debido a que hay pequeñas cantidades de Ag presentes, los 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 puede visualizar como grumos o detectar instrumentalmente.

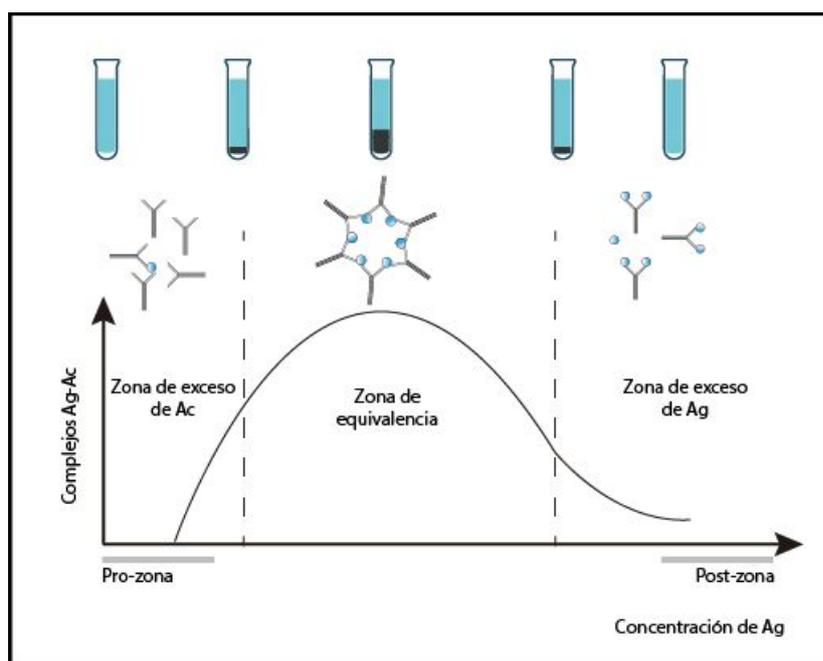


Fig. 1.16. Curva de aglutinación durante la interacción Ag-Ac ante concentraciones variables de antígeno.

1.7.2 Evaluación de un Inmunoensayo

Con mucha frecuencia los resultados de las pruebas diagnósticas están distribuidos en una escala continua, por lo que es necesario seleccionar un valor de corte o “*cut-off*” 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 S, 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 mínimos efectos adversos y que económicamente sea viable. Clásicamente, la exactitud de una prueba diagnóstica se evalúa a partir de los conceptos de S y E. La S 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 E 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 S y su E 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 (del inglés, "Receiver Operating Characteristics"). Las curvas ROC tuvieron sus primeras aplicaciones en medicina en el campo del radiodiagnóstico (Metz, 1978, 1986). Robertson y Zweig (1981) y Van Steirteghem y col. (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 y col., 1982; Ryan y Bilous, 1983; Marchand y col., 1983; Leroux y col., 1984; Kim y col., 1984; Carson y col., 1985; Hermann y col., 1986; Leung y col., 1989; Kazmierczak y col., 1991; Dupont y col., 1991; De Wit y col., 1991; Ricker y col., 1991; Amico y col., 1991; Lott y Lu, 1991; Guyatt y col., 1992; Flack y col., 1992; Zweig y col., 1992; Kazmierczak y col., 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 constituye una generalización de los conceptos clásicos de S y E. 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 S/E 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/E correspondiente a un nivel de decisión determinado. Una prueba con discriminación perfecta, tiene una curva ROC que pasa por la esquina superior izquierda ($S = E = 1$). 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 S y una E tan próximas al 100 % como fuera posible (Fig. 1.17). 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 de 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 S y la E se pueden obtener directamente del gráfico.

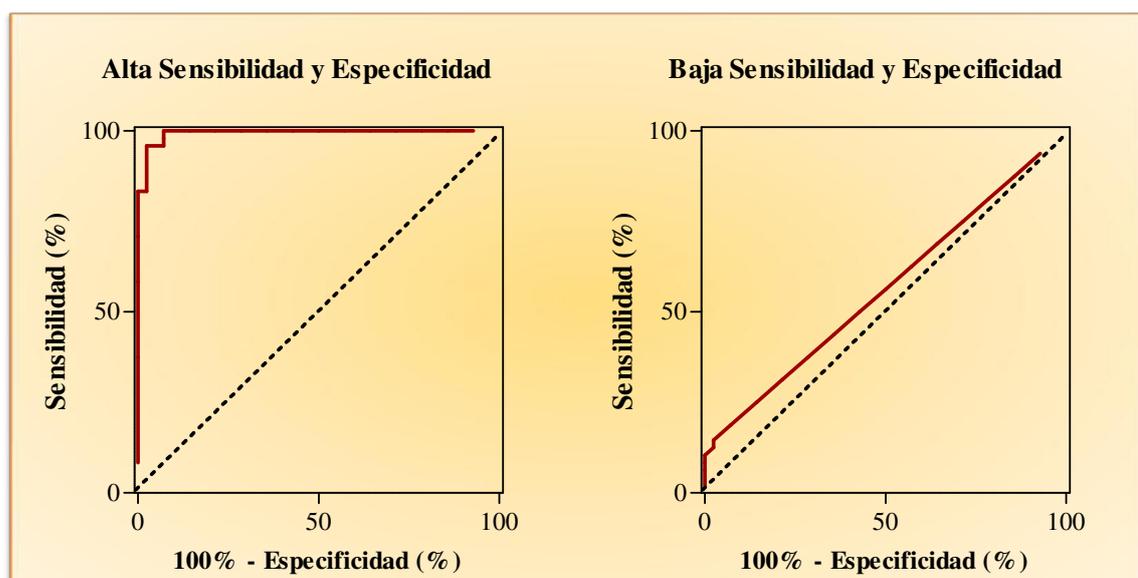


Fig. 1.17. Representación esquemática de curvas ROC en dos situaciones extremas.

Finalmente, uno de los parámetros más importantes de una curva ROC en el estudio de test diagnósticos es el área bajo la curva (AUC, del inglés “Area Under the Curve”). El AUC brinda información sobre la discriminación entre las poblaciones analizadas de manera independiente del valor de corte seleccionado. Esta área varía entre 0,5 y 1. Si el $AUC = 1$ la discriminación es perfecta, mientras que si $AUC = 0,5$ la discriminación es totalmente aleatoria. Según la clasificación propuesta por Swets y Pickett (1982), la discriminación diagnóstica del test es mala si el valor de AUC se encuentra entre 0,5 y 0,7; el test podría ser útil sólo en algunos casos si el valor de AUC se encontrara entre 0,7 y 0,9; mientras que valores mayores a 0,9 indican un buen desempeño diagnóstico.

CAPÍTULO 2:

Síntesis Controlada, Limpieza y Caracterización de Látex Funcionalizados

2.1. INTRODUCCIÓN

Los coloides poliméricos particulados o látex para uso biomédico resultan ser de gran interés gracias a la diversidad de aplicaciones que brindan (Pichot y col., 1997). Una de ellas es la producción de reactivos de aglutinación para el diagnóstico de enfermedades o estados patológicos (Cohen y Benedek, 1975; Quast y col., 1978; Litchfield y col., 1984; Kapmeyer y col., 1988; Kapmeyer, 1991; Montagne y col., 1992; Basinska y Slomkowski, 1993; Peula y col., 1995; Santos y Forcada, 1996; Quesada y col., 1996; Sarobe y col., 1996; Ortega-Vinuesa y col., 1996a; Miraballes-Martínez y col., 1997; Molina-Bolivar y Ortega-Vinuesa, 1999; Peula-Garcia y col., 2002; Ramos y col., 2003; Okumura y col., 2004; Lucas y col., 2006; Wang y col., 2006; Chen y col., 2007; Dey y col., 2007; Magalhães Andrade y col., 2007; Polpanich y col., 2007; Okumura y col., 2008; Gonzalez y col., 2008b, 2010; Yang y col., 2010; Moraveji y col., 2012; Miranda y col., 2009; García y col., 2013, 2014).

Las distribuciones de tamaños de partículas (PSD, del inglés “Particle Size Distribution”) de los látex utilizados en inmunodiagnóstico deben ser lo más angostas posible. Los látex deben ser monodispersos para: a) aumentar la estabilidad coloidal; b) asegurar un reparto homogéneo de las proteínas sobre la superficie de las partículas (Tsaur y Fitch, 1987); y c) lograr una mejor visualización de la reacción de aglutinación que se produce en el inmunoensayo.

Con el objetivo de obtener látex apropiados para su uso como reactivos de inmunoaglutinación (IA), que sean monodispersos, de tamaño controlado y con determinadas funcionalidades químicas y densidad de carga superficial controlada, se

llevaron a cabo distintos tipos de reacciones de polimerización en medio disperso acuoso.

La síntesis de látex monodispersos de poliestireno (PS) estuvo orientada a obtener látex de diversos tamaños, en un rango de 100-1100 nm. Las partículas más pequeñas se sintetizaron por polimerización en emulsión convencional, mientras que las de mayor tamaño se produjeron por polimerización en dispersión.

En las polimerizaciones en emulsión convencional, el monómero (en este caso estireno, St) es poco soluble en el medio de dispersión acuoso. Como consecuencia, se produce una emulsión formada por gotas de monómero dispersas en agua, que se ve favorecida con el empleo de emulsificantes (Em). Los Em son moléculas anfipáticas que presentan en su estructura la característica de poseer un extremo hidrofílico y una cadena hidrofóbica. Así, a partir de una determinada concentración conocida como concentración micelar crítica (CMC), el Em no se disolverá en el medio y formará micelas que tendrán sus extremos hidrofílicos orientados hacia el medio acuoso y las cadenas hidrofóbicas hacia el interior de las mismas. En presencia de gotas de monómero y de una concentración de Em superior a la CMC, una fracción de las moléculas de Em estabilizará a las gotas de monómero y otra fracción formará micelas, que contendrán monómero disuelto en su interior. Para unas dadas condiciones de agitación, a mayor concentración de Em, mayor será la superficie que puede ser estabilizada. Cuando se agrega el iniciador, normalmente disuelto en agua, éste se descompone en la fase acuosa y los radicales libres generados crecen por propagación con el monómero disuelto hasta hacerse hidrofóbicos y entran en las micelas para continuar propagando y formar las partículas de polímero (etapa de nucleación micelar). El principal sitio para la formación de polímero son las partículas de polímero hinchadas con monómero, mientras que las gotas de monómero actúan como reservorio desde donde difunden las moléculas de monómero hacia las partículas. El rango de tamaños obtenidos por polimerización en emulsión abarca aproximadamente partículas desde 50 nm hasta 700 nm.

En cambio, las polimerizaciones en dispersión comienzan en una sola fase homogénea. El medio de dispersión se selecciona de forma tal que el monómero, el estabilizador estérico y el iniciador sean solubles en él. Cuando se agrega el iniciador, el mismo se descompone y se generan radicales libres que dan lugar al inicio de la polimerización. Cuando las cadenas crecientes de polímero alcanzan un tamaño crítico

se tornan insolubles y precipitan fuera del medio para formar partículas de polímero. De esta forma, se pueden obtener partículas monodispersas de mayores tamaños que con polimerizaciones en emulsión, en el rango aproximado de 500-10.000 nm (0,5-10 μm).

En esta Tesis, los látex de PS obtenidos por ambos procesos, además de ser estudiados para la producción de reactivos de IA, fueron utilizados como siembras para la obtención de partículas con distintas funcionalidades superficiales y con morfología núcleo coraza o “core-shell”. Se estudiaron políticas de operación discontinuas y semicontinuas de los reactores de polimerización y se modificaron las recetas de las reacciones para obtener látex con distintas funcionalidades y densidades de carga sobre la superficie de las partículas.

Para la caracterización morfológica y de tamaños de partícula de los sistemas coloidales se pueden utilizar técnicas de: i) observación directa; ii) dispersión de luz; y iii) fraccionamiento (Gugliotta y col., 2010). Entre las primeras se encuentran la microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés “Transmission Electron Microscopy”) y la microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés “Scanning Electron Microscopy”), que presentan como ventaja la posibilidad de visualizar de manera directa las partículas para determinar su forma y tamaño. Estas técnicas presentan la desventaja que sólo permiten observar una pequeña fracción de partículas en relación a la población total, cuya selección es crítica a la hora de que sea representativa y por lo tanto podrían presentar inconvenientes para cuantificar pequeñas fracciones de partículas contaminantes y PSD anchas. Si bien TEM y SEM constituyen las principales técnicas de referencia para observar y caracterizar partículas de látex, las mediciones son costosas y requieren de mucho tiempo; la preparación de la muestra es compleja y la evaluación adecuada de la PSD puede involucrar el recuento de miles de partículas (Kourti, 1989; Lloset y col., 1996; Gugliotta y Vega, 2010).

La técnica de dispersión de luz dinámica (DLS, del inglés “Dynamic Light Scattering”) a simple ángulo produce estimaciones rápidas y confiables de los diámetros de partícula promedio. Sin embargo, pueden dar lugar a estimaciones bastante inexactas de la PSD (Kourti, 1989; Lloset y col., 1996; Gugliotta y col., 2000; Gonzalez y col., 2005; Gugliotta y col., 2010). Cuando dichas mediciones se realizan a múltiples ángulos y/o a múltiples longitudes de onda, mejora la estimación de la PSD (Clementi, 2012). 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 y col., 2005).

La caracterización superficial de las partículas coloidales es importante 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 (σ) puede determinarse mediante valoración conductimétrica (Hen, 1974; Sakota y Okaya, 1976; Labib y Robertson, 1980; Shirahawa y Suzawa, 1985; Zwetsloot y Leyte, 1996; Gonzalez, 2004; Gonzalez y col., 2008; Garcia, 2011). 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). Del mismo modo, se puede determinar la densidad de grupos funcionales superficiales (δ_x), provenientes del iniciador o de los monómeros funcionales empleados.

Una de las características fundamentales de un sistema coloidal es su estabilidad o resistencia a la coagulación. La estabilidad coloidal del sistema es la capacidad de las partículas de permanecer como entidades aisladas en el medio que las rodea durante largos períodos de tiempo. Cuando esto ocurre el sistema es estable; si por el contrario, las partículas coagulan, el sistema es inestable. La estabilidad de un látex se puede medir mediante la concentración crítica de coagulación (c.c.c.), que se define como la mínima concentración de un electrolito a la que coagulan 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, se recomiendan los métodos instrumentales, como DLS, turbidimetría y nefelometría (Ortega-Vinuesa y col., 1997). Además, la estabilidad coloidal puede estudiarse mediante la evaluación electrocinética del sistema, determinando la movilidad electroforética (μ_e) de las partículas y su potencial Zeta (ζ). Estos parámetros brindan información sobre la carga efectiva de las partículas, que es diferente a la densidad de carga obtenida por titulación conductimétrica.

En este Capítulo se incluye la síntesis controlada de partículas de distintos tamaños, grupos funcionales y densidades de carga superficial. Se sintetizaron partículas tipo “core-shell” con funcionalidades carboxilo o epoxi, producidas mediante un proceso de 2 etapas. En la primera etapa, se obtuvieron látex de PS de diferentes tamaños, mediante polimerizaciones en emulsión en presencia de Em o a través de polimerizaciones en dispersión. En la segunda etapa, las partículas de PS fueron empleadas como siembra en copolimerizaciones en emulsión, en ausencia de Em, empleando: i) St y ácido metacrílico (MAA, del inglés “Methacrylic Acid”), para proveer a las partículas de funcionalidad carboxilo, o ii) St y glicidil metacrilato (GMA), para proveer a las partículas de grupos epoxi superficiales.

Luego de la limpieza de los diferentes látex para eliminar restos de monómero no reaccionado, sales, Em y otros reactivos, se realizó la caracterización de los mismos, determinándose diámetros medios de partícula, índice de polidispersidad (IP), densidades de carga (σ) y de grupos funcionales superficiales (sulfato, $\delta_{\text{SO}_4^-}$; carboxilo, δ_{COOH} ; y epoxi, $\delta_{\text{C}_2\text{H}_3\text{O}}$), movilidad electroforética (μ_e), potencial Zeta (ζ) y concentración crítica de coagulación (c.c.c.).

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 reactores de vidrio encamisados de 200 mL y 1 L de capacidad, con baño termostático para regular la temperatura de reacción, agitación mecánica proporcionada por paletas de acero inoxidable, y entradas para carga de reactivos, burbujeo de N_2 y toma de muestra. En la Fig. 2.1 se muestra un esquema de los reactores utilizados y la fotografía de uno de ellos.

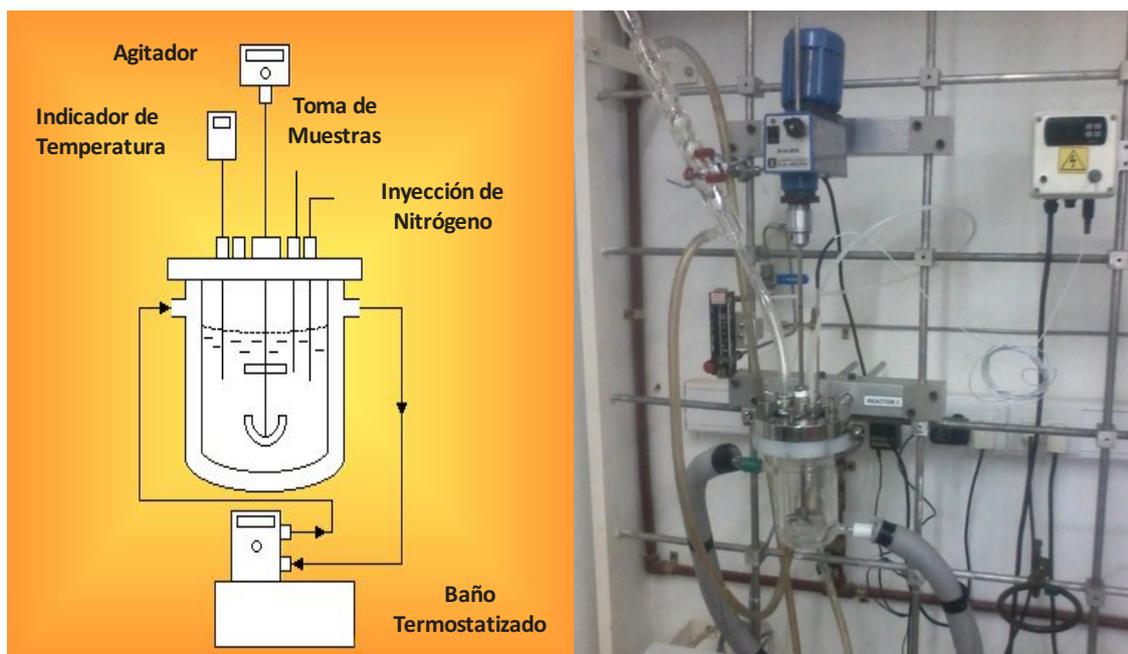


Figura 2.1. Esquema y foto del sistema de reacción empleado para llevar a cabo las polimerizaciones.

Se empleó St de grado técnico (Petrobras Energía S.A., Argentina), el cual fue destilado a presión reducida y 50 °C previo a su uso, para eliminar inhibidores e impurezas. Los monómeros MAA (Merk, pureza >99 %) y GMA (Aldrich, pureza >97 %) se emplearon como fueron suministrados por los fabricantes. El emulsificante utilizado fue dihexil sulfosuccinato de sodio ($C_{16}H_{29}O_7NaS$, Aerosol MA-80). Los iniciadores usados fueron persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$, Mallinckrodt, pureza >99 %) y azobisisobutilonitrilo (AIBN, Molekula, pureza 99,2 %). Otros reactivos empleados fueron bicarbonato de sodio $NaHCO_3$ (Cicarelli), polivinilpirrolidona (PVP, Sigma-Aldrich), hidroquinona (Fluka), etanol (Merck) e isopropanol (Anedra). Durante la caracterización superficial de los látex sintetizados, se empleó: NaOH, HCl, biftalato de potasio ($C_8H_5KO_4$), tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$) y carbonato de sodio (Na_2CO_3), todos de Cicarelli. Durante todo el trabajo, se empleó agua destilada ultrapura y deionizada (DDI).

Durante las reacciones se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo e inmediatamente se detuvo la reacción con el agregado de una gota de una solución de hidroquinona al 1 %. El seguimiento de la conversión monomérica (x) se llevó a cabo por gravimetría y la evolución de los tamaños medios de partícula (D_{DLS}) por DLS a

30 °C y a un ángulo de detección de 90°. Para estas últimas mediciones, se empleó 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). La concentración de las partículas en la medición se ajustó hasta obtener una intensidad promedio en el detector equivalente a 2×10^5 cuentas/s y los tiempos de medición fueron entre 100 y 200 segundos (Gugliotta y col., 2010).

Para el cálculo de la conversión por gravimetría, la muestra se colocó en una cápsula de aluminio de peso conocido, con una cantidad medida de hidroquinona (recién agregada). Se secó el látex en estufa a 35 °C hasta pesada constante y la conversión global de monómeros se calculó de la siguiente forma:

$$x = \frac{\frac{P_{MS}}{P_L} - \frac{P_{SNP}}{P_T} - \frac{P_S}{P_T}}{\frac{M_T}{P_T}} \quad (\text{Ec. 2.1})$$

donde P_{MS} es el peso de la muestra seca, P_L es el peso del látex, P_{SNP} es el peso de los sólidos no poliméricos (sales provenientes del iniciador, del buffer, del emulsificante, de la hidroquinona), P_T es el peso total, P_S es el peso de la siembra y M_T es el peso del monómero total.

2.2.1.2. Látex de Poliestireno por Polimerización en Emulsión

Se sintetizaron 3 látex de PS en base a la receta propuesta por Gonzalez (2004), modificada, principalmente con la inclusión de Em. En la Tabla 2.1 se muestran las recetas y condiciones utilizadas para la síntesis, por polimerización en emulsión, de los látex de PS, y la conversión y diámetros de partícula finales alcanzados.

Tabla 2.1. Recetas y condiciones de síntesis discontinua empleadas; y conversiones y diámetros medios de partícula finales alcanzados en las polimerizaciones en emulsión de estireno a 90 °C.

	S8	S9	S10
Agua (g)	556	556	556
Estireno (g)	234	217	234
Emulsificante, MA-80 (g)	7,6	11,9	8,8
Relación MA-80/St	0,032	0,055	0,038
Buffer, NaHCO₃ (g)	0,9	0,9	0,9
Iniciador, K₂S₂O₄ (g)	0,9	0,9	0,9
Temperatura (°C)	90	90	90
Tiempo (h)	12	8	8
Conversión, x (%)	98	100	100
Diámetro de Partícula, D_{DLS} (nm)	300	85	130

En primer lugar, se cargó el reactor con una solución conteniendo el NaHCO₃, el MA-80 y el agua (reservando una pequeña cantidad para disolver el iniciador). Se elevó la temperatura del baño termostatzado a 90 °C y se mantuvo el sistema en agitación bajo corriente de N₂. Una vez alcanzada la temperatura de reacción, se agregó el monómero y se esperó a que la temperatura vuelva a ser la deseada. Finalmente, se agregó el iniciador disuelto en agua para dar comienzo a la reacción de polimerización. En la Fig. 2.2 se muestra la evolución de la conversión y de los diámetros medios de partícula en función del tiempo de reacción obtenidos a lo largo de las polimerizaciones para la producción de los látex de PS S8, S9 y S10. En todos los casos, las conversiones fueron cercanas al 100 % y las velocidades de reacción fueron mayores a las reportadas para polimerizaciones similares pero en ausencia de Em (Gonzalez y col., 2008).

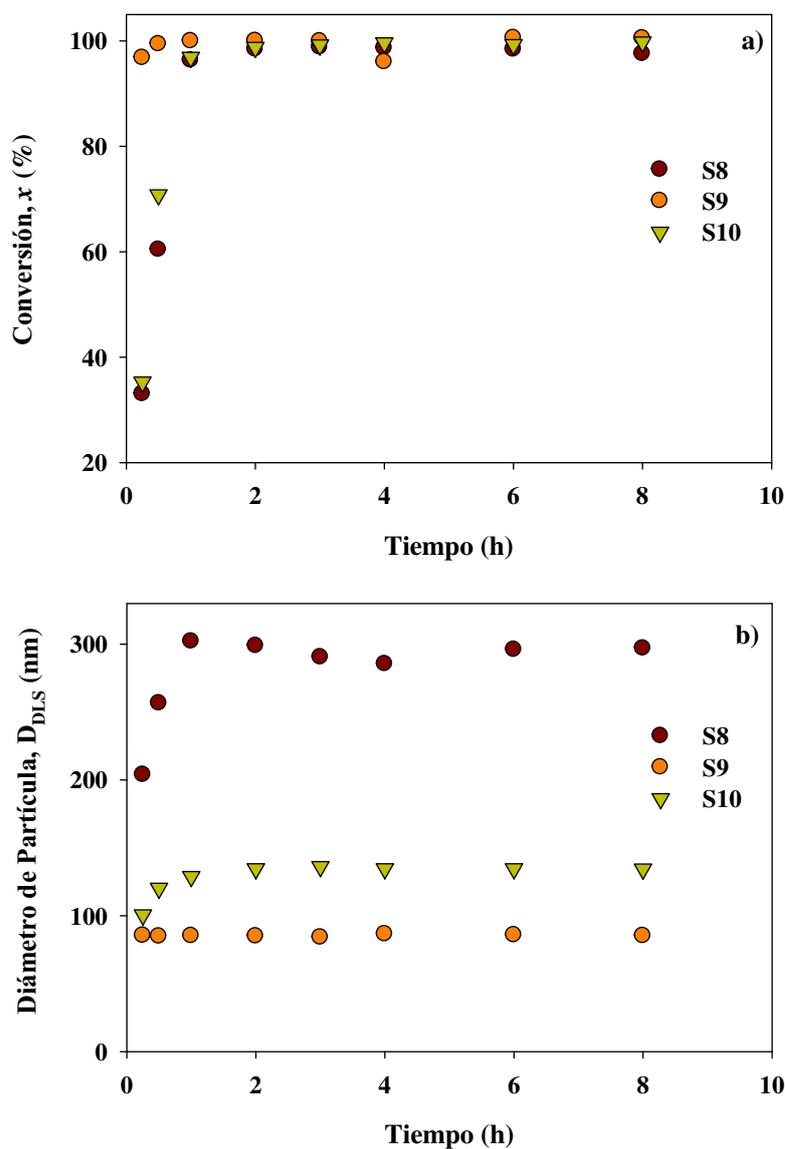


Figura 2.2. Evolución de la conversión monomérica (a) y de los diámetros medios de partícula medidos por DLS a 90° (b) en función del tiempo de reacción, para la síntesis de los látex de PS S8, S9 y S10.

En las síntesis de los látex S8 y S10, la máxima conversión se alcanzó a los 60 minutos de reacción y luego se mantuvo constante; y en el caso del látex S9 se alcanzó la máxima conversión a los 40 minutos de reacción. Estas observaciones pueden explicarse por la presencia de una importante concentración de Em, que permite acelerar la velocidad de nucleación por vía micelar y obtener partículas de menor tamaño a altas velocidades de reacción. Nótese también, que el D_{DLS} crece hasta

alcanzar el valor máximo al mismo tiempo que se observa la mayor conversión. Para el látex S9 no se detectó este crecimiento, ya que en la primera muestra tomada se determinó el D_{DLS} máximo, probablemente debido a la alta velocidad de la reacción.

2.2.1.3. Látex de Poliestireno por Polimerización en Dispersión

Se sintetizaron 5 látex de PS mediante polimerización en dispersión. Se emplearon mezclas de agua/alcohol o alcohol puro como medio de reacción, utilizándose los alcoholes etílico o isopropílico. Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en el reactor de 200 mL de capacidad. En primer lugar, se cargó al reactor el estabilizador estérico PVP, el medio de dispersión (reservando una pequeña cantidad para disolver el iniciador) y el St. Se elevó la temperatura del baño termostático a 70 °C y comenzó la agitación mecánica y el burbujeo de N_2 . Pasados 30 minutos, se agregó el iniciador AIBN disuelto en la fracción de medio reservada, y la temperatura de reacción se mantuvo en 70 °C. En la Tabla 2.2 se muestran las recetas y condiciones de reacción empleadas, la conversión final alcanzada y los diámetros medios de partícula de los látex sintetizados. En la Fig. 2.3 se muestra la evolución de la conversión y de los diámetros medios de partícula en función del tiempo de reacción para la síntesis de los látex de PS S11 a S15.

Las reacciones de síntesis de los látex S11 y S12 alcanzaron conversiones finales de 67 % y 70 %, respectivamente. Del seguimiento de la conversión en el tiempo se observó que para el látex S11 la misma estaba creciendo con elevada velocidad de reacción al momento en que se detuvo la polimerización. En estos 2 casos los D_{DLS} resultaron mayores a 2 μm y los valores obtenidos por DLS no son reportables porque superan el rango de utilización de la técnica de DLS. Además, ambos látex resultaron ser inestables, seguramente debido a su gran tamaño. Las reacciones de polimerización de los látex S13 y S14 presentaron los mayores valores de conversión, alcanzando al final de la reacción valores cercanos al 100 %. Además, se observó que la mezcla alcohol etílico/agua, en una proporción 2,2:1 resultó la más adecuada para obtener látex estables de tamaños cercanos al micrón.

En las reacciones S13, S14 y S15 se evaluó el efecto del estabilizador estérico (PVP), y de las concentraciones de AIBN y de St, con el objetivo de disminuir el tamaño de las partículas (Zhou y Dai, 2013). En estos experimentos se observó que: i) la mayor presencia de PVP no significó un menor tamaño medio de partícula; ii) la presencia de una menor concentración de AIBN tampoco redundó en disminuir el D_{DLS} ; y iii) la menor cantidad de monómero inicial implicó una menor velocidad de reacción y conversión final, aunque el diámetro obtenido fue similar a los casos anteriores. En las condiciones experimentales estudiadas en esta Tesis, la modificación de esas variables no logró disminuir el D_{DLS} final. Además de estas variables, en este tipo de polimerizaciones el sistema de agitación juega un rol fundamental, y probablemente para obtener partículas de menor tamaño se deba modificar el sistema empleado.

Tabla 2.2. Recetas y condiciones de síntesis discontinua empleadas; y conversiones y diámetros medios de partícula finales alcanzados en las polimerizaciones en dispersión de estireno a 70 °C.

	S11	S12	S13	S14	S15
Agua (g)	-	30,86	40,02	40,14	40,38
Alcohol Etilico (g)	125,5	-	88,26	89,9	89,8
Alcohol Isopropilico (g)	-	94,04	-	-	-
Relación Alcohol:Agua	1:0	3:1	2,2:1	2,2:1	2,2:1
Estireno (g)	18,06	13,60	9,86	9,98	5,16
PVP K-30 (g)	3,16	0,91	2,02	2,52	2,50
Iniciador, AIBN (g)	0,40	0,22	0,35	0,27	0,274
Temperatura (°C)	70	70	70	70	70
Tiempo (h)	8	12	10	10	10
Conversión, x (%)	67	70	99,9	100	75
Diámetro de Partícula, D_{DLS} (nm)	-	-	1043	1051	1048

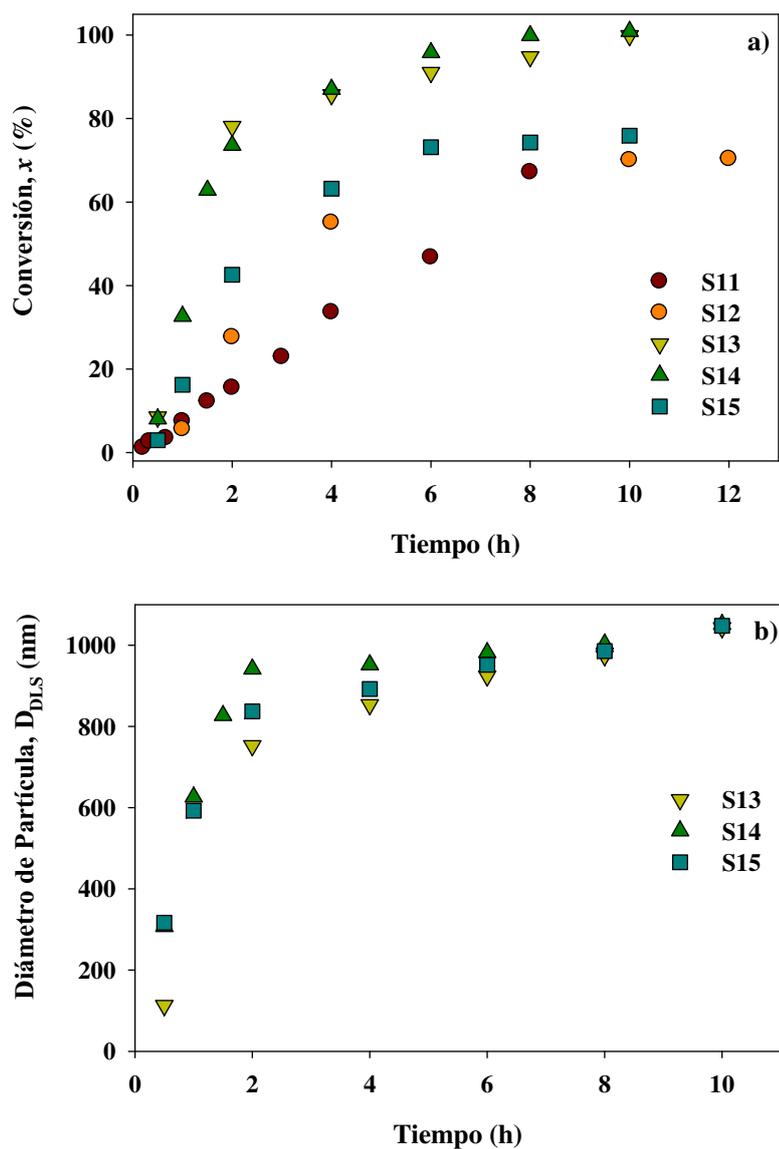


Figura 2.3. Evolución de la conversión monomérica (a) y de los diámetros medios de partícula medidos por DLS a 90° (b) en función del tiempo de reacción para la síntesis de los látex de PS S11, S12, S13, S14 y S15.

2.2.1.4. Látex con Funcionalidad Carboxilo

La síntesis de los látex con funcionalidad carboxilo se realizó en base a la receta propuesta en Gonzalez y col. (2008a), mediante copolimerización en emulsión de St y MAA, en ausencia de Em, sobre los látex de PS S8, S10 y S13, que se usaron como siembra. Las recetas y condiciones de síntesis se presentan en la Tabla 2.3. En la Fig. 2.4 se muestra la evolución de la conversión y de los diámetros medios de partícula en función del tiempo de reacción para los cinco látex carboxilados.

Tabla 2.3. Recetas y tiempos de reacción empleados; y conversiones y diámetros de partícula finales alcanzados en las polimerizaciones presembradas y discontinuas en emulsión de estireno y ácido metacrílico a 70 °C.

	S8C1	S8C2	S10C1	S10C2	S13C1*
Agua (g)	461,4	462,7	413,45	414,67	112,03
Siembra (g_{pol})	6,49	6,31	5,83	4,43	1,40
Estireno (g)	3,49	4,04	6,72	2,54	0,34
Ácido Metacrílico, MAA (g)	0,47	0,99	1,02	0,19	0,09
Relación MAA/St	0,13	0,25	0,15	0,08	0,24
Iniciador, K₂S₂O₄ (g)	1,05	2,10**	1,05	1,05	0,27
Tiempo (h)	12	12	12	12	6
Conversión, x (%)	75,6	86,17	49,53	56,39	98,84
Diámetro de Partícula, D_{DLS} (nm)	340	354	193	180	1133

*Otros ingredientes fueron: MA-80: 0,57 g y NaHCO₃: 0,27 g

** La mitad del iniciador se cargo en "batch" y el resto a t = 4 h

Para las siembras S8 y S10 se variaron las relaciones MAA/St con el objetivo de obtener diferentes densidades de carga superficial y de grupos carboxilo, y analizar su efecto en partículas de tamaño conocido. Se cargó inicialmente en el reactor la siembra de PS, los monómeros y el agua, y se mantuvo el sistema bajo agitación a temperatura

ambiente y bajo corriente de N_2 durante 2 horas, para producir el hinchamiento de las partículas y reducir la cantidad de O_2 presente. Se elevó luego la temperatura a $70\text{ }^\circ\text{C}$ y se adicionó el iniciador. En el caso de la síntesis del látex S8C2, se realizó una inyección de iniciador transcurridas 4 horas de reacción para elevar la conversión final de la polimerización y la densidad de carga superficial proporcionada por los grupos sulfato del iniciador y por los grupos carboxilo del MAA. Después del agregado impulsional del iniciador se observó un salto en la x alcanzándose un valor final de 86 %. Las conversiones finales de los látex S10C1 y S10C2 fueron bajas, lo que podría deberse en gran parte a la formación de una importante cantidad de coágulo, que no fue cuantificada.

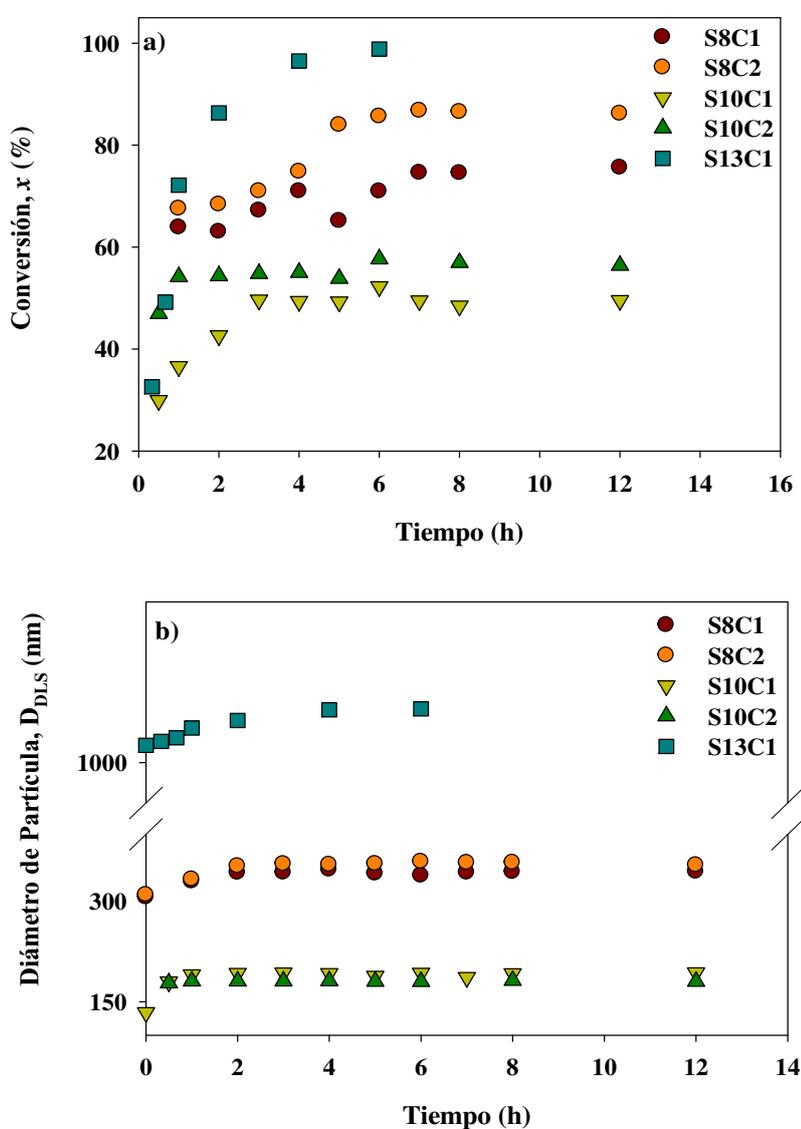


Figura 2.4. Evolución de la conversión monomérica (a) y de los diámetros medios de partícula medidos por DLS a 90° (b) en función del tiempo de reacción, en la síntesis de los látex carboxilados S8C1, S8C2, S10C1, S10C2 y S13C1.

Respecto de la síntesis del látex S13C1, se agregaron a la receta original dos ingredientes: el emulsificante MA-80 y NaHCO_3 , con el objetivo de aportar estabilidad a las partículas y mantener un pH alcalino, ya que en un primer intento de reacción sin estos agregados el sistema se inestabilizó observándose coágulos. La concentración de Em empleada se encontró por debajo de la CMC, para evitar la presencia de micelas y la nucleación de nuevas partículas. En este caso la conversión final llegó a alrededor del 99 %.

Además, debemos mencionar que los D_{DLS} finales de los látex carboxilados obtenidos implicaron un crecimiento bajo de los D_{DLS} de las siembras empleadas. De esta forma, se logró el objetivo de incorporar grupos funcionales y aumentar la densidad de carga, sin variar apreciablemente el diámetro medio fijado en la síntesis de los látex base de PS. Además, la polidispersidad del sistema se mantuvo similar a la de los látex de PS, lo cual es indicio de que no se formaron nuevas partículas.

2.2.1.5. Látex con Funcionalidad Epoxi

La síntesis de los látex con funcionalidad epoxi se realizó mediante copolimerización en emulsión de St y GMA sobre el látex S8 y en ausencia de Em. Las recetas y las condiciones de síntesis se presentan en la Tabla 2.4. El reactor se cargó inicialmente con la siembra de PS, la mezcla de monómeros y el agua; y se mantuvo el sistema bajo agitación a temperatura ambiente y bajo corriente de N_2 durante 2 horas, para producir el hinchamiento de las partículas. Luego, se elevó la temperatura a 70 °C y se adicionó el iniciador para dar comienzo a la polimerización. Con el objetivo de obtener diferentes densidades de carga superficial y de grupos epoxi se varió la relación GMA/St. Además, en la síntesis del látex S8E2 se realizó una inyección semicontinua intermedia de monómeros e iniciador. En la Fig. 2.5 se presenta la evolución de la conversión y del diámetro medio de partícula en función del tiempo de reacción para ambas reacciones (S8E1 y S8E2).

Tabla 2.4. Recetas y tiempos de reacción empleados; y conversiones y diámetros de partícula finales alcanzados en las polimerizaciones presembradas en emulsión de estireno y glicidil metacrilato a 70 °C.

	S8E1	S8E2
Agua (g)	94,99	88,54
Siembra (g_{pol})	1,50	1,51
Estireno (g)	0,97	1,78*
Glicidil Metacrilato, GMA (g)	0,42	2,04*
Relación GMA/St	0,43	1,14
Iniciador, K₂S₂O₄ (g)	0,74**	0,56**
Tiempo (h)	8	8
Conversión x (%)	69,32	80,02
Diámetro de Partícula (D_{DLS}, nm)	362,5	519,5

*Se cargo la mitad en "batch" y el resto se inyectó a $t = 3$ h;

** Se cargo 0,37 g en "batch" y el resto se inyectó a $t = 4$ h;

En la reacción del látex S8E1 la conversión final alcanzada en el tiempo experimentado fue del 69 %, aunque de la Fig. 2.5a se puede inferir que este valor hubiera sido más elevado si la reacción se hubiera detenido a un tiempo mayor. Para el látex S8E2 la conversión fue mayor e igual al 80 %, alcanzándose este valor máximo aproximadamente a las 4 h de reacción. El agregado impulsional de iniciador ($t = 4$ h) en las 2 reacciones se manifestó en un salto en la x a partir de este tiempo en ambos casos. El D_{DLS} final obtenido para el látex S8E1 fue similar a los obtenidos para los látex carboxilados S8C1 y S8C2, lográndose el objetivo de incorporar grupos funcionales epoxi sin modificar sustancialmente el tamaño de partícula de la siembra de PS S8. Sin embargo, para el látex S8E2 el D_{DLS} final obtenido fue mayor que el esperado. Es posible que esta situación se deba a la mayor cantidad de monómero empleada y a un aumento en la polidispersidad del sistema, lo que influyó de manera importante sobre el diámetro medio de partícula.

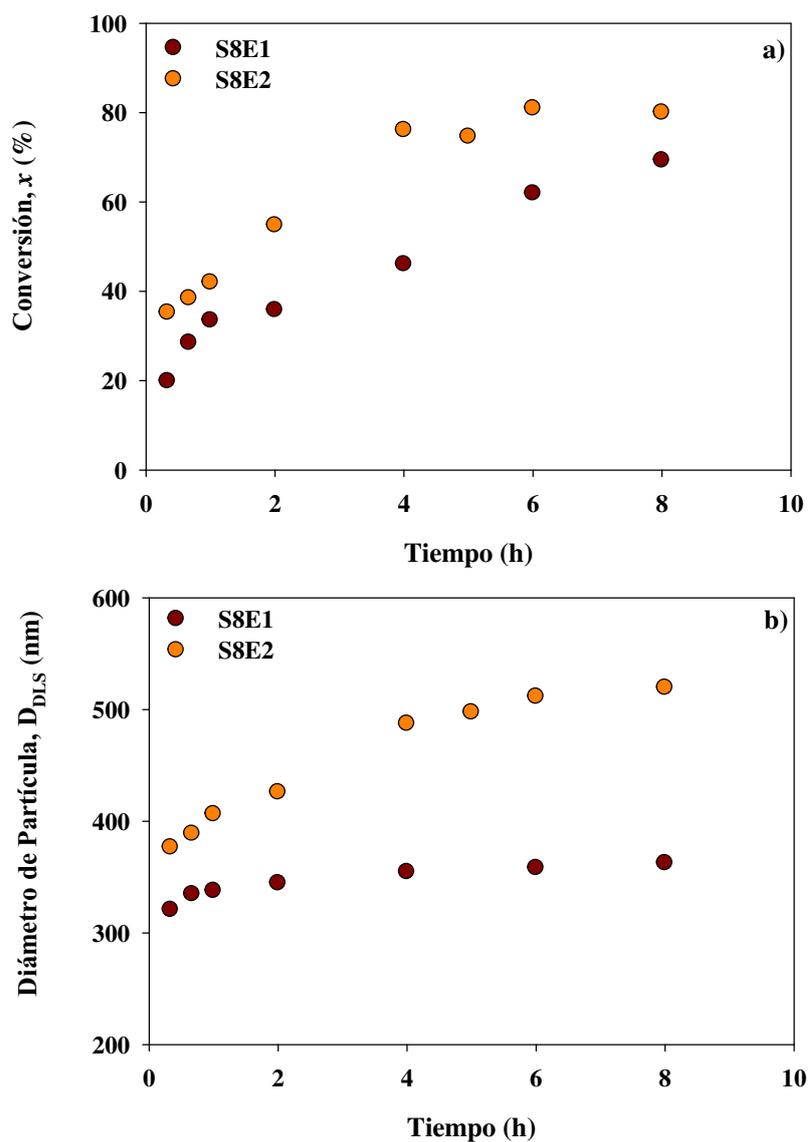


Figura 2.5. Evolución de la conversión monomérica (a) y del diámetro medio de partícula medido por DLS a 90° (b) en función del tiempo de reacción para la síntesis de los látex epoxidados S8E1 y S8E2.

2.2.2. Limpieza de los Látex

Los látex obtenidos luego de las polimerizaciones deben ser purificados, ya que contienen restos de monómero sin reaccionar, sales, EM y oligómeros. Existen distintos métodos que permiten la purificación de las partículas sintetizadas, tales como diálisis,

desplazamiento de suero y centrifugación/resuspensión. En esta Tesis se emplearon los dos últimos métodos mencionados.

La técnica de desplazamiento de suero consiste en colocar el látex en una celda que cuenta con un filtro microporoso en su base, soportado sobre un disco perforado de polietileno. Por la parte superior se hace circular agua ultrapura para arrastrar los componentes solubles, mientras que las partículas quedan retenidas por el filtro. El sistema permite la agitación magnética, para evitar que las partículas sedimenten y taponen el filtro. Durante el lavado de los látex, se analizó el agua a la salida del sistema, mediante la determinación de: i) la conductividad eléctrica (C), como indicador de las sales presentes; y ii) la tensión superficial (TS), como indicador de la presencia de EM. El lavado continuó hasta que estas características fueron similares a las del agua ultrapura ($C \leq 2 \mu\text{S/cm}$; $TS = 71,9 \times 10^{-3} \text{ N/m}$).

Para el látex S8, en la Fig. 2.6 se presenta la evolución de la C y de la TS del agua a la salida del sistema de lavado en función del volumen desplazado en la limpieza continua del látex por desplazamiento de suero.

También se empleó el método de series de centrifugaciones y redispersiones para realizar el lavado de los látex. En este caso, el procedimiento consistió en centrifugar los látex, eliminar el sobrenadante y redispersar las partículas en agua DDI. Este procedimiento se repitió 3 veces, asegurando la eliminación de los componentes no deseados de los látex.

2.2.3. Caracterización de los Látex Sintetizados

Para caracterizar los distintos látex obtenidos, se determinó: el diámetro medio de partícula por DLS a 90°; el índice de polidispersidad por SEM o TEM; la densidad de carga y de grupos funcionales superficiales mediante titulación conductimétrica; el espesor de la “hairy layer” (h) por DLS a 90°; la movilidad electroforética y el potencial Zeta, por velocimetría de láser doppler, y la concentración crítica de coagulación frente al agregado de KBr, por el método visual y por DLS. En las Tablas 2.5 a 2.7 se

presentan las características antes mencionadas, medidas para los látex de PS y para los látex con funcionalidades carboxilo y epoxi, respectivamente.

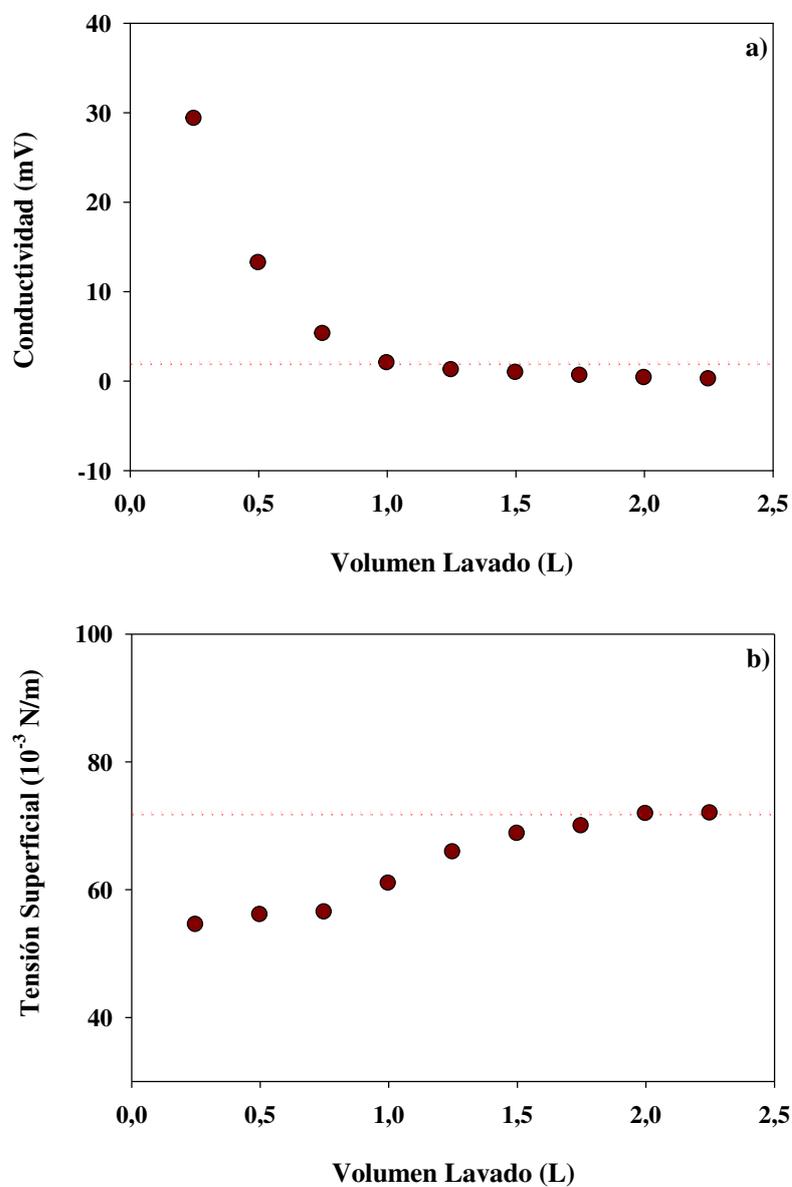


Figura 2.6. Seguimiento del lavado del látex S8. Evolución de la conductividad eléctrica (a) y de la tensión superficial (b) del agua a la salida del sistema de lavado en función del volumen de agua desplazado (Las líneas de puntos indican la conductividad eléctrica y tensión superficial del agua ultrapura).

Tabla 2.5. Características de los látex de PS sintetizados en emulsión (S8 y S10) y en dispersión (S13), medidas sobre los látex lavados.

	S8	S10	S13
D_{DLS} (nm)	300	134	1043
IP	1,007	1,010	1,003
h (nm)*	5,58	5,33	6,58
σ (μC/cm²)	25,0	17,0	-
δ_{SO₄⁻} ×10⁻⁷ (mEq/cm²)	2,6	2,4	-
μ_e ×10⁸ (m²/Vs)*	5,34	5,28	3,82
ζ (-mV)*	69,3	69,5	49,1
c.c.c._{vis} (mM KBr)			
a pH 6	200	50	150
a pH 8	200	50	150
c.c.c._{DLS} (mM KBr)			
a pH 6	50	50	100
a pH 8	100	50	100

*Determinado a pH 6

2.2.3.1. Determinación de los Diámetros Medios de Partícula

Los diámetros medios de partícula, D_{DLS} , se determinaron por DLS, empleando un equipo Brookhaven Instruments Inc. Se utilizó un láser de He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm) polarizado verticalmente y un correlador digital (modelo BI-2000 AT).

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 a 90° y a una temperatura de 30 °C.

El grado de monodispersidad de los látex se analizó mediante MDLS. Se realizaron mediciones desde 50° hasta 120°, con intervalos de 10° y a 30 °C. La concentración de las partículas se ajustó a cada ángulo de medición hasta obtener alrededor de 2×10^5 cuentas/s para asegurar un régimen de dispersión de luz simple; y los tiempos de medición utilizados fueron entre 100 y 200 segundos (Gugliotta y col., 2010).

Tabla 2.6. Características de los látex con funcionalidad carboxilo sintetizados por polimerización presembrada en emulsión a partir de las siembras S8, S10 y S13.

	S8C1	S8C2	S10C1	S10C2	S13C1
Relación MAA/St	0,13	0,25	0,15	0,08	0,24
D_{DLS} (nm)	340	354	193	180	1134
IP	1,021	1,027	1,017	1,029	1,005
h (nm)*	8,60	11,50	11,18	7,75	14,18
σ ($\mu\text{C}/\text{cm}^2$)	78,5	161,7	171,1	72,9	91,5
$\delta_{\text{SO}_4^-} \times 10^{-7}$ (mEq/cm²)	2,4	3,8	3,5	4,1	4,4
$\delta_{\text{COOH}} \times 10^{-7}$ (mEq/cm²)	5,7	13,0	14,3	3,5	5,1
$\mu_e \times 10^8$ (m²/Vs)*	4,90	4,05	4,36	4,84	3,06
ζ (-mV)*	62,90	52,00	56,10	62,00	39,30
c.c.c._{vis} (mM KBr)					
a pH 6	350	2000	>2000	300	200
a pH 8	650	>2000	>2000	600	400
c.c.c._{DLS} (mM KBr)					
a pH 6	200	1700	>2000	100	100
a pH 8	250	>2000	>2000	200	200

*Determinado a pH 6

Tabla 2.7. Características de los látex con funcionalidad epoxi sintetizados por polimerización presembrada en emulsión a partir de la siembra S8.

	S8E1	S8E2
Relación GMA/St	0,43	1,14
D_{DLS} (nm)	362	519
IP	1,016	1,069
h (nm)*	13,1	12,2
σ (μC/cm²)	59,3	44,4
δ_{SO₄⁻ × 10⁻⁷ (mEq/cm²)}	6,14	4,6
δ_{C₂H₃O} × 10⁻⁷ (mEq/cm²)	0,93	1,75
μ_e × 10⁸ (m²/Vs)*	3,82	3,41
ζ (-mV)*	48,80	43,9
c.c.c._{vis} (mM KBr)		
a pH 6	300	350
a pH 8	300	350
c.c.c._{DLS} (mM KBr)		
a pH 6	200	250
a pH 8	200	250

*Determinado a pH 6

En el análisis de los látex por MDLS, es importante destacar que si un látex es estrictamente monodisperso, el D_{DLS} no variaría con el ángulo de detección. En la Fig. 2.7 se presentan los D_{DLS} de los látex S8, S8C1, S8C2 y de un látex de PS estándar de similar tamaño medio, en función del ángulo de medición.

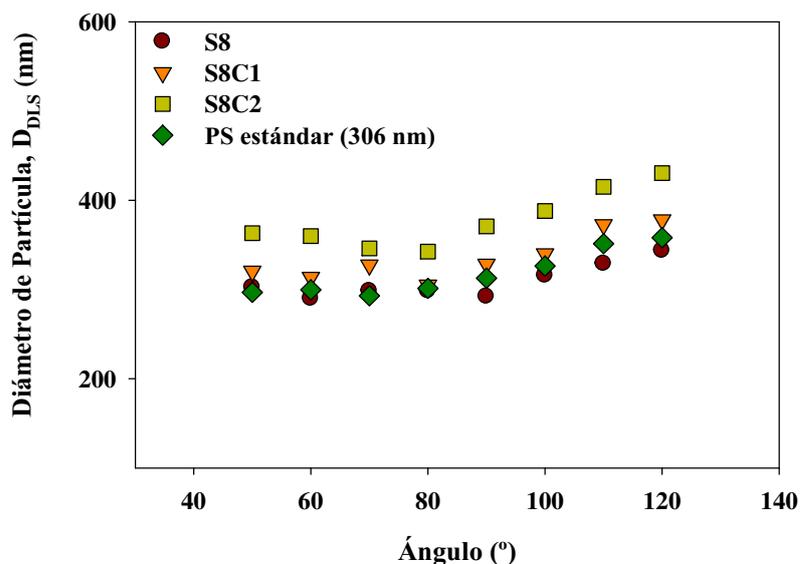


Figura 2.7. Diámetro medio de partícula medido por MDLS para los látex S8, S8C1, S8C2 y para un látex estándar de PS de 306 nm de diámetro nominal.

Se observa que, en general, el D_{DLS} a ángulos menores a 90° se mantiene casi constante, mientras que a mayores ángulos de medición el D_{DLS} aumenta en todos los casos. Se observa que para el látex de PS S8 el D_{DLS} mostró una variación con el ángulo de medición de aproximadamente 50 nm (292-343 nm); mientras que en el látex de PS estándar, la variación del D_{DLS} (293-358 nm) fue mayor e igual a 65 nm. Para los látex carboxilados S8C1 y S8C2, el D_{DLS} varió entre 304-378 nm y 342-430 nm, respectivamente, siendo las diferencias entre el valor máximo y mínimo de 74 nm para el S8C1 y de 88 nm para el S8C2.

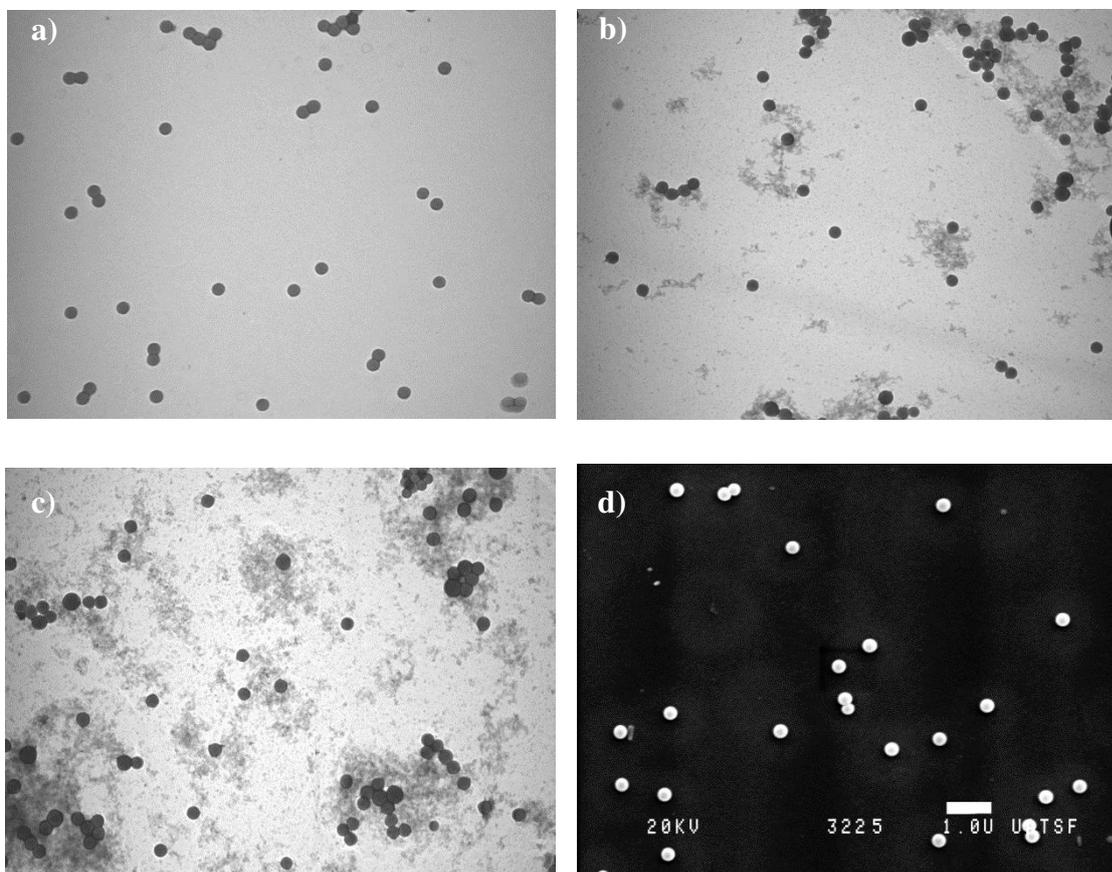
2.2.3.2. Cálculo del Índice de Polidispersidad

El IP se determinó a partir de micrografías de TEM o SEM. El equipo de TEM fue un Philips modelo EM300 disponible en el Instituto de Física de Rosario (CONICET-UNR). Para la preparación de las muestras, se utilizaron rejillas portamuestras de cobre, que fueron acondicionadas aplicando una película de Formvar sobre las mismas. Luego, se colocó una gota de látex diluido (aproximadamente 0,01 % p/p) conteniendo 0,01 % de ácido fosfotúngstico sobre la rejilla y se dejó secar a

temperatura ambiente. El equipo de SEM fue un JEOL-JSM 35C, disponible en el CONICET CCT-Santa Fe. 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.

Cada microscopio se calibró con un látex de PS estándar de tamaño similar a las muestras, y después de determinar el diámetro de alrededor de 500 partículas, se calculó el IP. En la Fig. 2.8 se muestran imágenes de SEM y TEM de los látex sintetizados.

En la mayoría de los casos, los látex presentaron baja polidispersidad, con IP entre 1,007 y 1,029, lo que indica que serían aptos para su empleo como reactivos de IA. Como excepción, el látex epoxidado S8E2 presentó una PSD más ancha, lo que queda de manifiesto en el elevado IP (IP = 1,069). Nótese que en la micrografía presentada de este látex se observa la presencia de partículas de tamaños claramente diferentes (Fig. 2.8h), lo que podría deberse a problemas asociados al proceso de síntesis, tales como agitación deficiente, presencia de O₂ hinchamiento insuficiente de las partículas y/o presencia de aglomerados o coágulos en la siembra de PS.



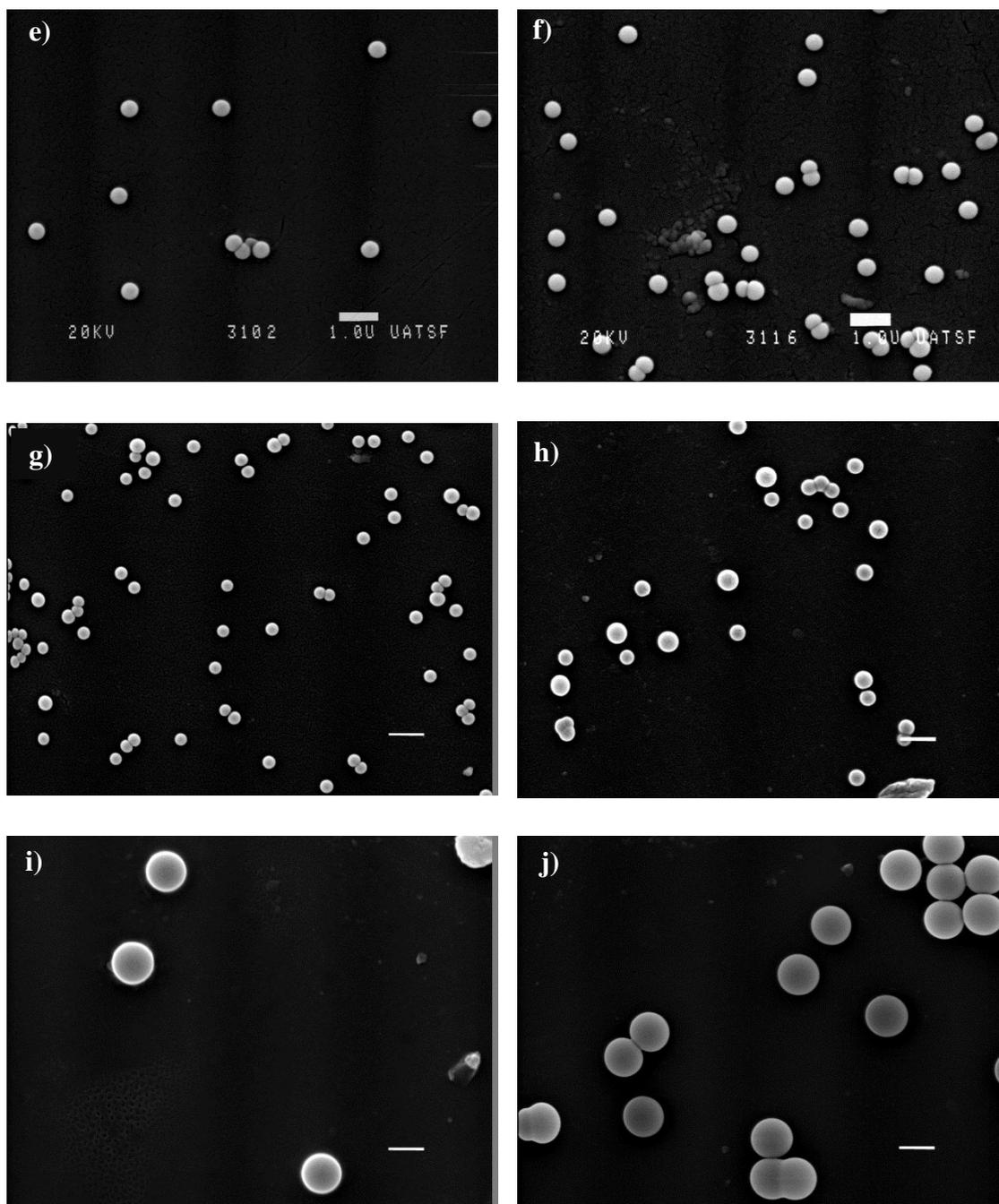


Figura 2.8. Micrografías de los látex: a) S10 (TEM), b) S10C1 (TEM), c) S10C2 (TEM), d) S8 (SEM), e) S8C1 (SEM), f) S8C2 (SEM), g) S8E1 (SEM), h) S8E2 (SEM), i) S13 (SEM), j) S13C1 (SEM). Magnificación TEM 12.000x. Magnificación SEM 10.000x.

2.2.3.3. Determinación del Espesor de la “Hairy Layer”

En la superficie de las partículas existen cadenas de polímero flexibles que conforman la denominada “hairy layer”, de espesor h . En las situaciones extremas, dichas cadenas pueden encontrarse extendidas hacia la solución o colapsadas sobre la superficie, dependiendo de la fuerza iónica (FI) del medio. El valor de h se calculó por diferencia entre el radio de partícula obtenido cuando las cadenas están totalmente extendidas y el obtenido cuando están colapsadas (Seebergh y Berg, 1995). Para ello, se realizaron mediciones de DLS variando la concentración de electrolito (KBr) desde 0 mM hasta 1000 mM. En todos los casos, el radio máximo se determinó en agua DDI (0 mM), mientras que el radio mínimo se obtuvo a distintas concentraciones (entre 1 mM y 100 mM) de KBr.

En la Fig. 2.9 se grafica la evolución de los diámetros medios de partícula de los látex S8, S8C1 y S8C2 frente a concentraciones variables de KBr. Se observa que los D_{DLS} disminuyeron desde un valor máximo, donde las cadenas de la “hairy layer” se encuentran totalmente extendidas en agua DDI, por la repulsión electrostática entre ellas; hasta un valor mínimo, donde las cadenas se encuentran colapsadas sobre la superficie de las partículas, por efecto de la presencia de contraiones que apantallan la carga eléctrica de las cadenas. A concentraciones mayores de electrolito, el D_{DLS} aumenta por agregación de las partículas. El espesor de h se obtuvo a partir del D_{DLS} máximo medido en agua y el D_{DLS} mínimo medido a una determinada concentración de KBr, como se indica esquemáticamente en la Fig. 2.9.

El espesor de la “hairy layer” h , fue mayor para los látex carboxilados y epoxidados que para los látex de PS, mostrando que el espesor h no sólo depende de la FI del medio, sino también del tipo de grupo químico presente en las cadenas flexibles de polímero, de su hidratación y de su concentración (Goossens y Zembrod, 1979).

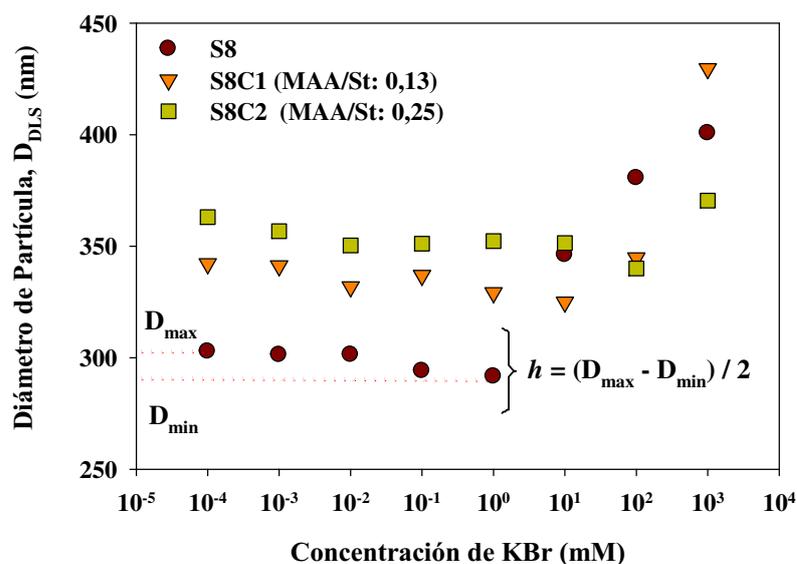


Figura 2.9. Evolución de los diámetros medios de partícula de los látex S8, S8C1 y S8C2 frente a concentraciones variables de KBr. Las líneas de puntos indican los diámetros máximo (D_{\max}) a baja fuerza iónica y mínimo (D_{\min}) de partícula que permiten calcular el espesor de la “hairy layer”.

2.2.3.4. Caracterización Superficial

Se determinó la densidad de carga superficial y la densidad de grupos funcionales superficiales ($\delta_{\text{SO}_4^-}$ y δ_{COOH}) mediante titulación conductimétrica. Se empleó un titulador automático marca KEM, modelo At-510. El agente valorante se dosificó automáticamente, con intervalos de espera de 10 segundos, para dar tiempo a una correcta homogenización de la mezcla valorada. El agente valorante empleado fue una solución acuosa de NaOH de concentración 0,02 M, previamente valorada con biftalato de potasio (sustancia patrón). Las valoraciones se realizaron a temperatura ambiente y hasta asegurar un exceso de NaOH.

2.2.3.4a. Cuantificación de los Grupos Sulfato

Todos los látex obtenidos por polimerizaciones en emulsión (convencional y presembradas) presentan en su superficie grupos sulfato provenientes del iniciador empleado ($K_2S_2O_8$).

El procedimiento empleado para la cuantificación de los grupos sulfato consistió en tomar un volumen determinado de cada látex a fin de obtener 0,1 g de polímero, agregarle agua DDI hasta completar un volumen de 150 mL y colocarlo en un recipiente bajo agitación magnética. Posteriormente se agregó 1 mL de HCl 1 M para lograr la protonación total de los grupos ionizables presentes en la muestra y a continuación se realizó la valoración con NaOH 0,02 M. En la Fig. 2.10 se muestra la curva de valoración obtenida para el látex S10. Se pueden observar 2 tramos de diferentes pendientes y las funciones de regresión lineal respectivas.

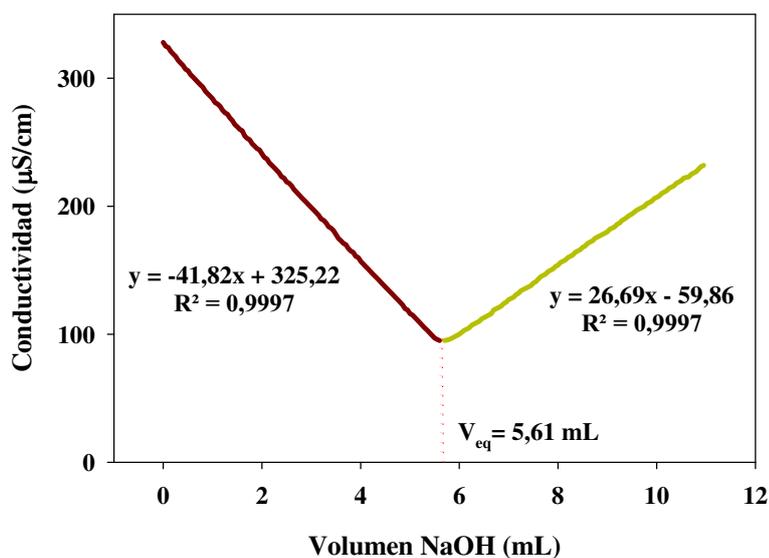


Figura 2.10. Valoración conductimétrica del látex de PS S10 para la determinación de los grupos sulfato superficiales.

Ante el agregado de NaOH, la conductividad disminuye debido al carácter ácido fuerte de los grupos sulfato que se van neutralizando, generando la pendiente negativa de la mitad izquierda de la Fig. 2.10. En efecto, los protones que actúan como contraiones de los grupos sulfato son progresivamente intercambiados por los cationes

Na^+ , y los H^+ y OH^- se unen para formar agua, disminuyendo la conductividad hasta llegar al punto final de valoración (V_{eq}). El NaOH consumido hasta este punto corresponde a la valoración de los grupos sulfato y a la neutralización del HCl previamente agregado. Superado éste, la pendiente aumenta por el exceso de NaOH.

Para calcular el V_{eq} se igualaron ambas funciones de regresión lineal y se calculó la incógnita x . El volumen de NaOH necesario para neutralizar los grupos SO_4^- ($V_{\text{eq,NaOH}}$) es V_{eq} menos el volumen correspondiente a la neutralización del HCl agregado (de concentración conocida). La densidad de grupos SO_4^- superficiales se calculó según:

$$\delta_{\text{SO}_4^-} = \frac{V_{\text{eq NaOH}} \cdot C_{\text{NaOH}}}{A_p} \quad (\text{Ec. 2.2})$$

con

$$A_p = \frac{6 \cdot m_p}{\rho_p \cdot D} \quad (\text{Ec. 2.3})$$

donde C_{NaOH} es la concentración de la solución valorante (mEq/L), A_p es el área total de las partículas (cm^2), m_p es la masa de polímero (g), ρ_p es la densidad del polímero (g/cm^3) y D es el diámetro de partícula (cm) asumido igual al medido por DLS, D_{DLS} .

Finalmente, la densidad total de carga superficial σ ($\mu\text{C}/\text{cm}^2$) está dada por:

$$\sigma = F \cdot \delta_{\text{SO}_4^-} \quad (\text{Ec. 2.4})$$

donde F ($= 96,5 \mu\text{C}/\text{mEq}$) es la constante de Faraday.

2.2.3.4b. Cuantificación de los Grupos Carboxilo

Los látex funcionalizados con grupos carboxilo S8C1, S8C2, S10C1, S10C2 y S13C1 presentan en su superficie grupos carboxilo provenientes del MAA y grupos sulfato provenientes del iniciador $K_2S_2O_8$.

El procedimiento de la valoración conductimétrica fue similar al descrito previamente. En la Fig. 2.11 se presenta la curva de valoración conductimétrica para el látex S10C1, donde se observan 3 tramos con pendientes diferentes.

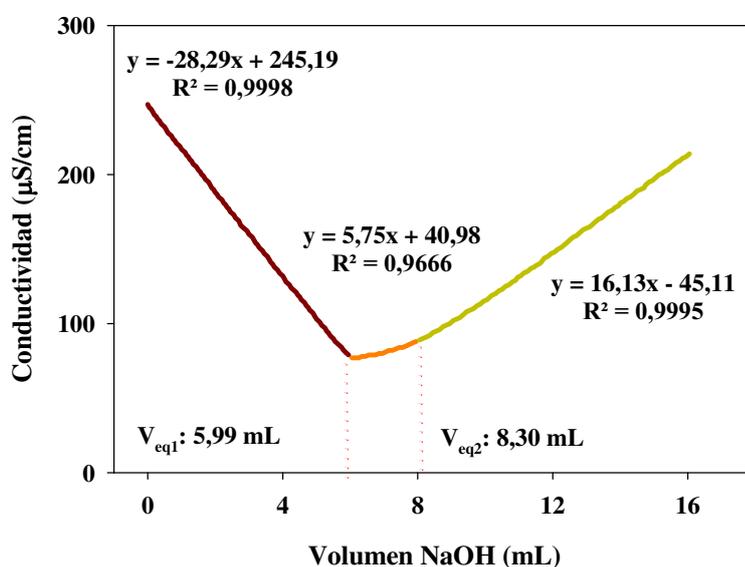


Figura 2.11. Valoración conductimétrica del látex carboxilado S10C1 para la determinación de los grupos sulfato y carboxilo superficiales.

El primer tramo corresponde a la valoración de los grupos sulfato (ácido fuerte), y a la neutralización del HCl adicionado. El segundo tramo a los grupos carboxilo (ácido débil), que presentan una pendiente diferente a la del ácido fuerte, porque los protones están menos disociados que en el caso del ácido fuerte y el intercambio de protones por contraiones Na^+ de la disolución de NaOH se refleja con un ligero aumento en la conductividad. Finalmente, el tercer tramo corresponde al exceso de NaOH.

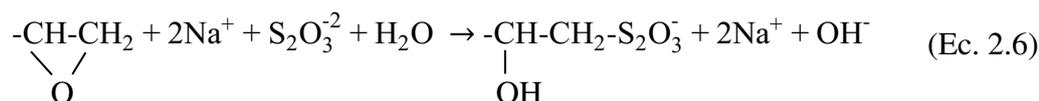
El procedimiento para el cálculo de los grupos sulfato fue igual al indicado anteriormente (2.2.3.4a.), mientras que la densidad de grupos COOH superficiales se calculó según:

$$\delta_{\text{COOH}} = \frac{(V_{\text{eq}2} - V_{\text{eq}1}) \cdot C_{\text{NaOH}}}{A_p} \quad (\text{Ec. 2.5})$$

donde $V_{\text{eq}1}$ corresponde al volumen en el cual se intersectan los 2 primeros tramos de la gráfica y $V_{\text{eq}2}$ corresponde al volumen donde ocurre la intersección de los últimos 2 tramos.

2.2.3.4c. Cuantificación de los Grupos Epoxi

Los grupos epoxi se cuantificaron mediante valoración potenciométrica (Sundberg y Porath, 1974; Chen y Lee, 1999; Hou y col., 2007). El ensayo se basa en una reacción redox entre el grupo epoxi y el tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) que conduce a la producción de OH^- de manera proporcional a la cantidad de anillos oxiranos (Ec. 2.6). Por lo tanto, se puede estimar la concentración molar de grupos epoxi titulando los OH^- producidos.



Para poner a punto la técnica, se determinó la densidad de grupos epoxi en una muestra del monómero GMA. En primer lugar se valoró una solución de HCl 0,01 N (solución valorante) con una solución de Na_2CO_3 como patrón primario. A continuación se pesaron 14,5 g de GMA y se disolvieron en agua DDI y metanol en una proporción 1:1, hasta completar un volumen de 50 mL. Luego se colocó la disolución bajo agitación magnética. Posteriormente se agregó $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en exceso y se dejó reaccionar durante 30 minutos, verificándose un aumento del pH como consecuencia de la producción de OH^- . Finalmente se realizó la valoración potenciométrica empleando la solución de HCl 0,01 N previamente valorada.

Para valorar los grupos epoxi de las muestras de látex, el procedimiento consistió en tomar un volumen determinado de cada látex a fin de obtener 0,1 g de polímero, y continuó como se describió en el párrafo anterior. En la Fig. 2.12 se muestran las curvas (y primera derivada) de la valoración potenciométrica obtenidas para el monómero GMA y para el látex S8E2.

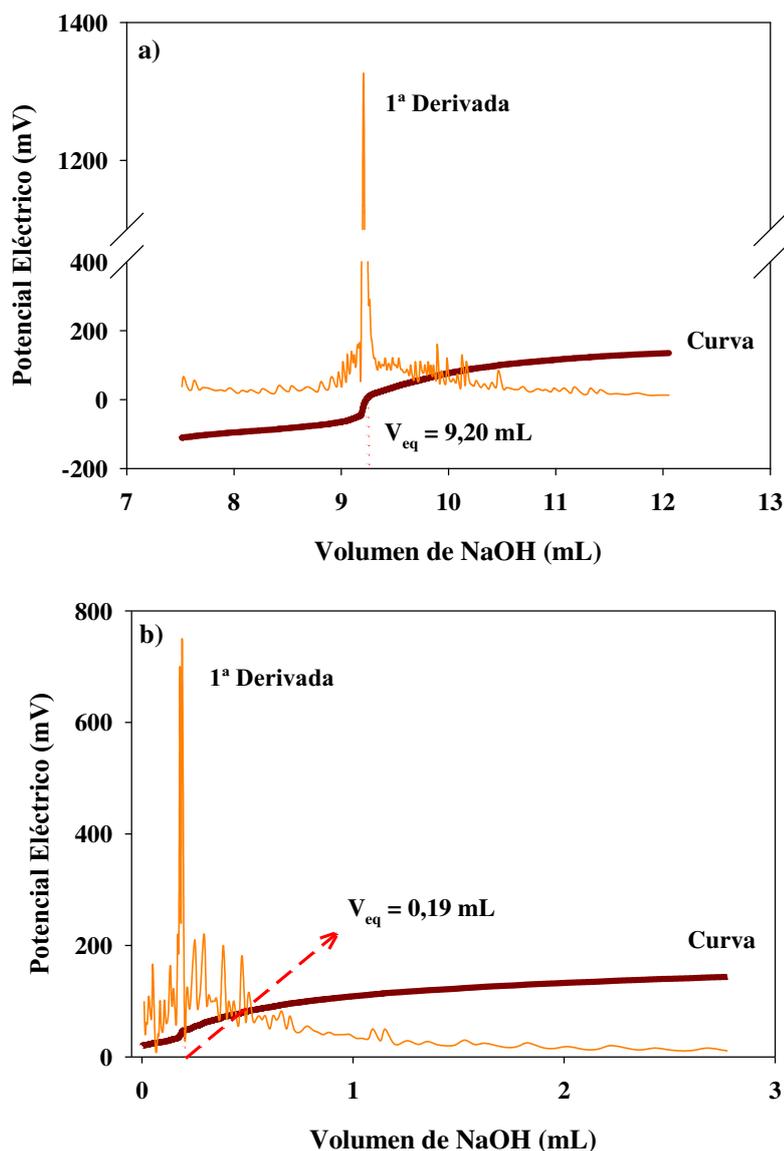


Figura 2.12. Valoración potenciométrica del monómero GMA (a) y del látex epoxidado S8E2 (b).

El punto final de la titulación corresponde al punto de inflexión de la curva de valoración, que puede determinarse con mayor precisión calculando la primera derivada

de la misma; el valor máximo de la primera derivada corresponde al volumen equivalente. Luego, la densidad de grupos C_2H_3O superficiales se calculó según:

$$\delta_{C_2H_3O} = \frac{V_{eq\ HCl} \cdot C_{HCl}}{A_p} \quad (\text{Ec. 2.7})$$

donde C_{HCl} es la concentración de la solución valorante (mEq/L).

Con este procedimiento, se determinó que los látex S8E1 y S8E2 presentaron diferentes densidades de grupos epoxi superficiales (Tabla 2.6), aunque estos resultados deberían ser contrastados con otras técnicas adicionales, debido a que fueron menores a los esperados, como por ejemplo los métodos propuestos por Kling y Ploehn (1995): i) método del HCl-dioxano modificado; y ii) método basado en la reacción del grupo epoxi con alquil-aminas solubles.

2.2.3.5. Estabilidad Coloidal

La estabilidad de un sistema coloidal es la capacidad de las partículas de permanecer como entidades aisladas en el medio que las rodea durante largos períodos de tiempo, para lo cual, deben existir fuerzas repulsivas que contrarresten y superen a las fuerzas atractivas entre las partículas. 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).

Se estudió la estabilidad coloidal de los látex sintetizados por dos vías: i) mediante la determinación de la concentración crítica de coagulación, donde se analiza la respuesta del látex frente al aumento de la FI del medio; y ii) mediante la determinación de la movilidad electroforética y del cálculo del potencial Zeta, lo que

brinda información sobre la carga efectiva de las partículas en el medio coloidal y la posición del plano de deslizamiento.

2.2.3.5a. Concentración Crítica de Coagulación

A medida que aumenta la FI del medio, la repulsión entre las partículas va disminuyendo debido al apantallamiento de las cargas producido por los contraiones, llegando a un determinado valor donde el sistema se inestabiliza y se producen coagulaciones. La c.c.c. corresponde a la mínima concentración de sal, en este caso KBr, necesaria para producir la agregación de las partículas.

Para determinar la c.c.c., 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 2000 mM). El paso siguiente fue preparar una serie de tubos conteniendo 1 mL de látex de concentración 0,2 mg/mL y 1 mL de solución de KBr a diferentes concentraciones. Los tubos se dejaron 24 h en baño de agua 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°. La determinaciones de las c.c.c. se realizaron a dos pHs diferentes, pH 6 y pH 8, para evaluar su efecto sobre la estabilidad coloidal de los látex.

En la Fig. 2.13 se muestra la evolución de los D_{DLS} a pH 6 para el látex S8C1 al aumentar la concentración de KBr. Se consideró alcanzada la c.c.c. cuando el diámetro medido se incrementó en un 10 % respecto al de la partícula en agua DDI.

En general, las c.c.c. obtenidas por el método visual resultaron 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.

Como puede observarse en la Tabla 2.5, los látex con mayor densidad de carga y de grupos superficiales (S8C2 y S10C1) presentaron los mayores valores de c.c.c. Los altos valores de c.c.c (>2000 mM) podrían explicarse por la combinación de dos mecanismos diferentes: la interacción electrostática producida principalmente por los

grupos carboxilo ionizados; y el efecto estérico debido a las cadenas hidrofílicas que sobresalen de la superficie de las partículas y que presentan un espesor h . La combinación de estos dos mecanismos se conoce como estabilización electroestérica. (Napper y col., 1983; Stenkamp y Berg, 1997; Peula y col., 1998; Forcada e Hidalgo-Álvarez, 2005).

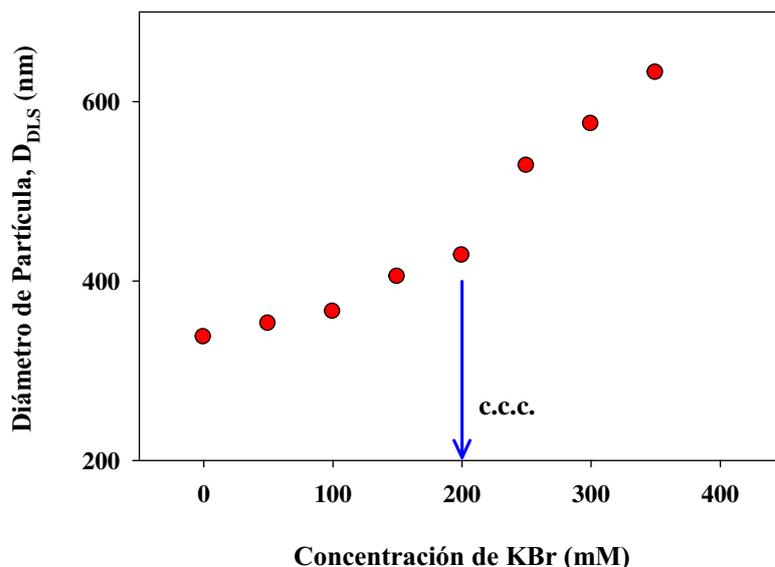


Figura 2.13. Determinación de la concentración crítica de coagulación del látex carboxilado S8C1. Evolución de los D_{DLS} al aumentar la concentración de KBr a pH 6.

Además, los látex con funcionalidad carboxilo presentaron mayores valores de c.c.c a pH 8 que a pH 6 (Tabla 2.6). En medio básico, los grupos carboxilo se encuentran ionizados y las cadenas hidrofílicas más extendidas. Como consecuencia de la elevada carga superficial negativa que poseen las partículas de látex en estas condiciones, 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 cambio, en los látex de PS y epoxidados los valores de c.c.c fueron prácticamente independientes del pH (Tablas 2.5 y 2.7), debido a que los grupos sulfato se encuentran desprotonados a ambos pHs. En el caso de los látex con funcionalidad epoxi, donde las cadenas de polímero que sobresalen de la superficie de las partículas

son más largas que en el caso de los látex de PS, se observaron mayores valores de c.c.c. debido a la estabilidad estérica que estas cadenas proporcionan.

2.2.3.5b. Movilidad Electroforética y Potencial Zeta

Se determinó la μ_e de los látex obtenidos a diferentes valores de pH, empleando un equipo ZetaSizer Nano (Malvern), perteneciente a la empresa Eriochem S.A., radicada en Colonia Avellaneda, Provincia de Entre Ríos. La μ_e se obtuvo mediante la realización de un experimento de electroforesis en la muestra y de la medición de la velocidad de las partículas utilizando velocimetría láser por efecto doppler. Luego, se aplicó la ecuación de Henry (Ec 1.7) para calcular el potencial Zeta como se mostró en el Capítulo 1, apartado 1.4.2.2. En la Fig. 2.14 se muestran las mediciones de μ_e obtenidas en función del pH para 6 de los látex sintetizados (2 de PS: S8 y S10; y 4 carboxilados: S8C1, S8C2, S10C1 y S10C2).

En todos los casos, μ_e aumentó con el pH y disminuyó con la densidad de grupos superficiales. A pH más altos la carga eléctrica de las partículas aumenta debido a que los grupos funcionales están más ionizados, aumentando la μ_e . Se debe notar que tanto la densidad de carga superficial como el tamaño de las partículas afectan la movilidad, aunque en los sistemas analizados el efecto eléctrico parece ser el prevalente.

Nótese que la μ_e de las partículas de PS fue mayor que la de las partículas carboxiladas, indicando que los látex de PS son sistemas electrostáticamente más estables. La μ_e debe ser interpretada en términos de la carga efectiva de las partículas, la cual es diferente a la densidad de carga superficial σ , medida por titulación conductimétrica. Mientras que σ brinda información sobre el tipo de grupos (fuertes o débiles) presentes en la superficie de las partículas y su cantidad por unidad de área; el estudio de los parámetros electrocinéticos (μ_e y ζ) aporta información sobre el comportamiento de la doble capa eléctrica de las partículas coloidales y su interacción con el medio que las rodea. En los látex analizados y bajo las condiciones experimentales evaluadas, hemos observado que los látex con mayor σ presentaron menor μ_e .

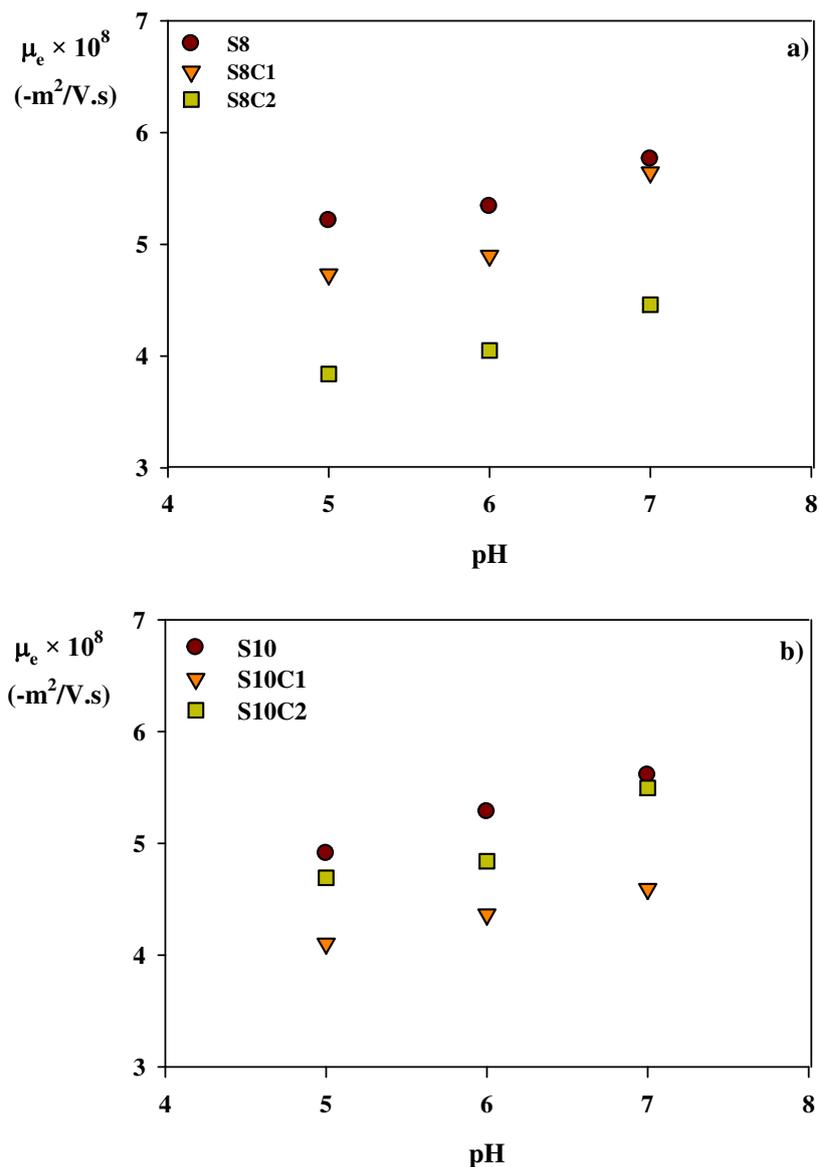


Figura 2.14. Movilidad electroforética del látex de PS S8 y de los látex carboxilados S8C1 y S8C2 (a) y del látex de PS S10 y de los látex carboxilados S10C1 y S10C2 (b) en función del pH.

Un comportamiento similar al antedicho fue descrito por Haro-Pérez y col. (2005) para liposomas con cantidades variables de carga eléctrica, y observaron que la carga efectiva disminuía cuando el número de grupos cargados aumentaba. Estos autores postularon que podría existir una condensación de iones en la superficie de las partículas debido a la gran carga de los liposomas; en cuyo caso sería necesario analizar un modelo de regulación química para estimar el grado de disociación de los grupos ionizables en estas condiciones. Por otro lado, Suzawa y Shirahama (1991) también

observaron un comportamiento similar, pero enfocaron su análisis en el estudio de la doble capa eléctrica. Ellos compararon un látex de PS y otros 2 látex carboxilados (copolímeros de St/2-Hidroxietil Metacrilato, HEMA) y observaron que el potencial Zeta (y la movilidad) fue mayor en el látex de PS que en el látex P(St/HEMA). Además, postularon que, en este último caso, existen cadenas de polímero hidratadas formando una “hairy layer” en la superficie de las partículas. Esto provocaría que la distancia (d) entre la superficie de las partículas y el plano de deslizamiento aumente y en consecuencia disminuya ζ (Fig. 2.15).

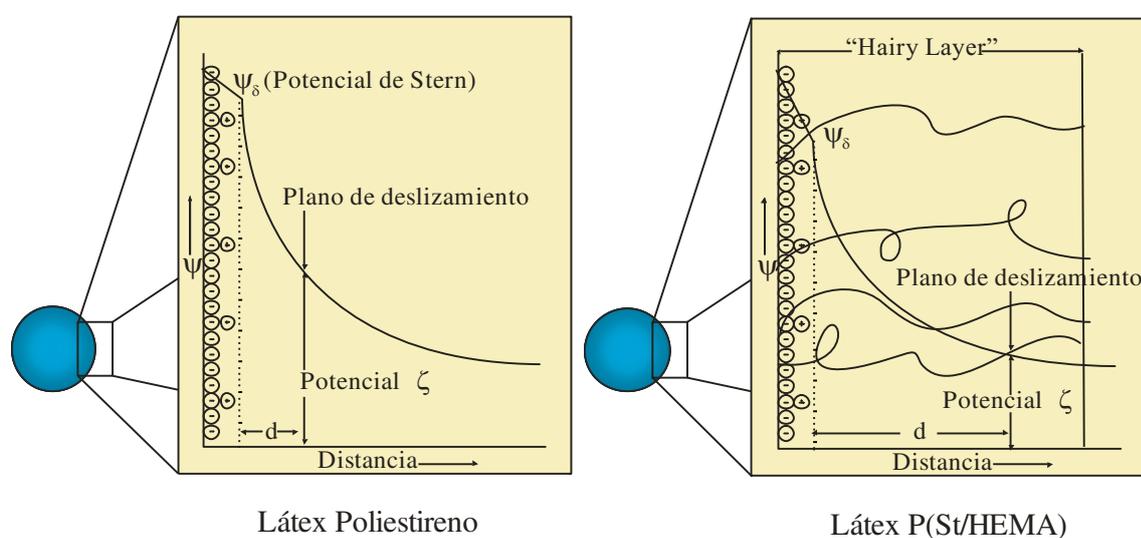


Figura 2.15. Representación esquemática de la doble capa eléctrica en la superficie de un látex de PS y en otro de P(St/HEMA). Adaptado de Suzawa y Shirahama, 1991.

2.3. CONCLUSIONES

En este Capítulo se presentó la síntesis de diferentes látex poliméricos. Se produjeron partículas de PS de tamaño variable utilizando distintas metodologías. Mediante polimerización en emulsión se sintetizaron partículas en el rango 85-300 nm. Mediante polimerización en dispersión se obtuvieron partículas estables en el rango 1000-1100 nm. Algunos de los látex de PS fueron empleados como siembras en la síntesis de partículas con morfología “core-shell” y funcionalidades carboxilo o epoxi.

Los principales resultados obtenidos durante la síntesis fueron los siguientes:

- En las reacciones de polimerización en emulsión para la producción de los látex de PS S8, S9 y S10 se alcanzaron conversiones altas (mayores al 98 %), y distintos tamaños de partícula, en función de la concentración de emulsificante (MA-80) empleada, resultando PSD con polidispersidades menores a 1,01.

- En las reacciones de polimerización en dispersión para la síntesis de los látex de PS S13 y S14, la conversión alcanzada fue cercana al 100 %, mientras que en los látex de PS S11, S12 y S15 resultaron conversiones menores (entre 67 % y 75 %). Las partículas obtenidas fueron de tamaños mayores a 1000 nm, algunos de los látex resultaron inestables y su diámetro no se pudo determinar por DLS. El índice de polidispersidad del látex S13 fue de 1,003.

- En la síntesis de las partículas funcionalizadas con morfología “core-shell” mediante polimerización presembrada en emulsión, se alcanzaron en general bajas conversiones (entre 49 % y 86 %), salvo en el caso del látex carboxilado S13C1 donde la conversión alcanzó el 99 %. Además, la variación de la relación de monómeros MAA/St y GMA/St en las recetas de los látex carboxilados y epoxidados, respectivamente, permitió modificar la densidad de carga y de grupos funcionales superficiales. Finalmente, el agregado impulsional de iniciador permitió elevar la conversión final y la densidad de carga superficial.

En la caracterización de los látex, los principales resultados mostraron que:

- En la mayoría de los casos se logró sintetizar látex con la monodispersidad de tamaños requerida para ser utilizados en test de inmunoaglutinación. Como excepción, el látex S8E2 presentó un mayor índice de polidispersidad, lo que podría influir negativamente en su desempeño en los inmunoensayos.

- Las partículas de látex obtenidas presentaron distinta funcionalidad superficial, con grupos sulfato provenientes del iniciador $K_2S_2O_8$ y grupos carboxilo o epoxi provenientes de los monómeros funcionales empleados.

- Los látex de PS producidos por polimerización en emulsión poseen grupos ácido fuerte superficiales, provenientes del iniciador utilizado, y en consecuencia la c.c.c. es poco afectada por el pH. En el caso de los látex con funcionalidad epoxi, donde las

cadena de polímero que sobresalen de la superficie de las partículas son más largas (mayor espesor de la “hairy layer”) que en el caso de los látex de PS, se observaron mayores valores de c.c.c. debido a la estabilidad estérica que estas cadenas proporcionan. En los látex con grupos ácido débil (carboxilo), donde el grado de ionización depende del pH del medio, la c.c.c. varió con el mismo, siendo mayor a pH 8 que a pH 6. Los altos valores de c.c.c. registrados en algunos de los látex carboxilados suponen que la estabilidad coloidal en estos sistemas es fruto de una estabilización electroestérica: el efecto electrostático se debe a las cargas superficiales, y el efecto estérico se debe a la presencia de cadenas de polímero flexible sobre la superficie de las partículas.

- La μ_e aumentó con el pH y disminuyó con la densidad de grupos carboxilo superficiales (látex S8C1, S8C2, S10C1 y S10C2). A pH más altos la carga eléctrica de las partículas aumenta debido a que los grupos funcionales están más ionizados, aumentando su μ_e . La movilidad de las partículas de PS fue mayor que la de las partículas carboxiladas y epoxidadas, indicando que los látex de PS son sistemas electrostáticamente más estables.

CAPÍTULO 3:

Obtención de Antígenos del *Toxoplasma gondii*

3.1. INTRODUCCIÓN

La Toxoplasmosis es una zoonosis causada por el parásito *Toxoplasma gondii*, ampliamente distribuida a nivel mundial. La detección de esta infección usualmente se realiza demostrando la presencia de anticuerpos (Ac) específicos en el suero del paciente. La presencia de inmunoglobulina isotipo G (IgG) específica permite saber si el paciente ha estado alguna vez en contacto con el parásito o no. Pero esta única determinación no es suficiente para inferir el momento en que el parásito infectó al paciente, y en algunos casos esta información es sumamente importante.

La Toxoplasmosis generalmente se presenta asintomática, y en la mayoría de los pacientes no es necesario ningún tipo de intervención médica porque el sistema inmune es capaz de controlarla de manera eficiente. Sin embargo, en el caso de personas inmunocomprometidas y embarazadas las consecuencias pueden ser muy graves, ya que en el primer caso el sistema inmune no responde satisfactoriamente y en el segundo caso existe riesgo de transmisión de la infección al feto.

La Toxoplasmosis adquirida durante la etapa de gestación, principalmente en el primer trimestre, puede producir aborto o inducir malformaciones, hidrocefalia, macro o microcefalia y lesiones oculares (Muñiz Hernández y Mondragón Flores, 2009), por lo que su detección en forma temprana es de gran relevancia.

Estas poblaciones sensibles deben ser analizadas con pruebas diagnósticas complementarias, como detección de inmunoglobulina isotipo M (IgM), inmunoglobulina isotipo A (IgA) o avidéz de IgG, para obtener información sobre el momento en que se produjo el contacto con el parásito. Estas pruebas generalmente son costosas, requieren personal altamente capacitado y suelen presentar resultados contradictorios.

Las principales técnicas utilizadas para el diagnóstico de la Toxoplasmosis son: reacción de Sabin-Feldman (SF), inmunofluorescencia indirecta (IFI), enzimoimmunoensayo (ELISA, del inglés “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”), prueba de inmunoabsorción y aglutinación (ISAGA, del inglés “Immunosorbent Agglutination Assay”), aglutinación directa (AD), prueba de avidez de los Ac, hemaglutinación indirecta (HAI) e inmunoaglutinación (IA).

La técnica de IA presenta las ventajas de ser rápida, sencilla, económica y de gran utilidad para su utilización en tamizajes, donde se deben evaluar gran cantidad de muestras. En una reacción de IA, los complejos látex-proteína antigénica (CLP) son reconocidos por Ac específicos presentes en los sueros de pacientes positivos. Cuando se encuentran en concentraciones adecuadas, los Ac se unen a los antígenos (Ag) del complejo y forman una red de aglutinación, que puede ser observada a simple vista o empleando técnicas instrumentales.

La mayoría de los métodos serológicos están basados en el uso de proteínas del extracto completo de taquizoitos del *T. gondii*, denominado homogenato. Como consecuencia, dada la complejidad de los extractos, resulta muy dificultosa la estandarización de los ensayos de diagnóstico, debido a que presentan una considerable variación en la reproductibilidad y confiabilidad de los resultados.

Parte de los problemas relacionados al uso del homogenato del parásito se podrían resolver empleando proteínas recombinantes del *T. gondii*, aumentando la sensibilidad y especificidad de los métodos diagnósticos, y/o mejorando la estandarización de los mismos. Además, el uso de técnicas de ingeniería genética permite diseñar proteínas con mejores características que las nativas, como por ejemplo antigenicidad, solubilidad y estabilidad.

El estudio de diferentes Ag recombinantes del *T. gondii* ha permitido seleccionar determinadas proteínas que reaccionan de manera diferencial con los Ac específicos generados en la etapa aguda de la enfermedad. Estas proteínas de fase aguda son excelentes candidatos para el desarrollo de kits diagnósticos que sean capaces de brindar información sobre el tipo de infección, es decir, si se trata de una infección recientemente adquirida o de una infección adquirida en el pasado.

Varias proteínas recombinantes del *T. gondii* han sido expresadas y probadas como Ag mediante ensayos de ELISA (Van Gelder y col., 1993; Redlich y Muller,

1998; Kimbita y col., 2001; Sager y col., 2003; Nigro y col., 2003; Pietkiewicz y col., 2004; Martin y col., 2004; Clemente y col., 2005; Cóceres y col., 2010; Jalallou y col., 2010; Chong y col., 2011). En particular, los Ag denominados P35 y P22 han mostrado ser buenos candidatos para detectar Ac de fase aguda (Parmley y col., 1992; Aubert y col., 2000; Suzuki y col., 2000; Li y col., 2000; Hiszczyńska-Sawicka y col., 2005). Sin embargo, las secuencias génicas de las proteínas evaluadas en esta Tesis (P35Ag y P22Ag) se diferencian de estas últimas en que han sido seleccionadas especialmente mediante un análisis de posibles epitopes antigénicos de relevancia para diferenciar la fase aguda de la Toxoplasmosis (Costa, 2014).

El objetivo de este Capítulo es la obtención del homogenato del *T. gondii*; y la expresión, purificación y caracterización de 2 proteínas recombinantes de fase aguda, denominadas P35Ag y P22Ag, para su posterior utilización en la formación de CLP. El empleo de proteínas recombinantes de fase aguda del *T. gondii* se realizó con tres propósitos bien establecidos: a) prescindir del uso del homogenato del *T. gondii*, debido a la dificultad y mal rendimiento que tiene el cultivo de este parásito; b) evitar el difícil y costoso proceso de purificación de proteínas a partir de un extracto del parásito; y c) permitir la discriminación de los sueros agudos, con respecto a los sueros crónicos y negativos.

3.2. TRABAJO EXPERIMENTAL

3.2.1. Materiales

3.2.1.1. Soluciones

- *Buffer carbonato para ensayos de ELISA*: Na₂CO₃ 15 mM; NaHCO₃ 35 mM; NaN₃ 3,1 mM (pH 9,6).

- *Buffer de corrida para SDS-PAGE*: Tris 0,025 M; glicina 0,192 M; SDS 0,1 % (pH 8,3).

- *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; β -mercaptoetanol 5 % v/v; azul de bromofenol 0,2 % p/v.

- *Buffer de resuspensión*: Na_2HPO_4 50 mM (pH 8); NaCl 300 mM.

- *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'-tetrametiletlenodiamina (TEMED) 0,1 % v/v; persulfato de amonio (APS) 0,05 % p/v.

- *Gel de resolución 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.

- *PBS*: NaCl 0,137 M; KCl 2,7 mM; Na_2HPO_4 0,01 M; KH_2PO_4 1,8 mM (pH 7,4).

- *PBS-Tween*: PBS; Tween 20 0,01 % v/v.

- *Solución de lavado para columna de Ni^{2+}* : Na_2HPO_4 50 mM (pH 8); NaCl 300 mM; imidazol 20 mM.

- *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 I*: etanol 45 % v/v; ácido acético 10 % v/v.

- *Solución decolorante para geles SDS-PAGE II*: etanol 12 % v/v; ácido acético 7 % v/v.

- *Solución para inducción*: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 50 mM.

- *Soluciones para la purificación en columna de Ni^{2+}* :

- o *E1*: Na_2HPO_4 50 mM (pH 8); NaCl 300 mM; imidazol 50 mM

- o *E2*: Na_2HPO_4 50 mM (pH 8); NaCl 300 mM; imidazol 100 mM

- o *E3*: Na_2HPO_4 50 mM (pH 8); NaCl 300 mM; imidazol 250 mM

- o *E4*: 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 de carne 1 %; extracto de levadura 0,5 %; NaCl 0,5 % (pH 7,5).

- *Medio para el crecimiento de E. coli*: caldo LB suplementado con ampicilina 0,1 mg/mL.

3.2.2. Obtención del Homogenato del *T. gondii*

El homogenato del parásito se obtuvo a partir de exudado peritoneal de ratones infectados. En primer lugar, se observó la composición del mismo bajo microscopio óptico para confirmar la presencia de los parásitos. A continuación, se centrifugó por 15 minutos a 2.000 rpm y luego los parásitos se resuspendieron en buffer de resuspensión. Este procedimiento de lavado se repitió 3 veces. La suspensión se sonicó en baño de hielo por 2 minutos a 400 W con un procesador ultrasónico de alta intensidad (Sonics), para provocar la lisis de los parásitos. Los restos celulares se separaron de la mezcla de proteínas antigénicas mediante centrifugación por 15 minutos a 2.000 rpm y se conservó el sobrenadante. Las proteínas solubles en el sobrenadante se cuantificaron por fluorometría empleando un equipo Qubit® 1.0, frente a una curva de calibrado realizada con patrones de albúmina sérica bovina (BSA).

3.2.3. Obtención de las Proteínas Recombinantes

En esta Tesis se trabajó con células transformadas de *Escherichia coli* BL21 (DE3) obtenidas por el Dr. Juan Gabriel Costa durante el desarrollo de su Tesis Doctoral (2014). Los trabajos se realizaron en el Laboratorio de Tecnología Inmunológica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, bajo la dirección del Dr. Iván Marcipar e involucraron la

amplificación del gen que codifica las proteínas recombinantes P35Ag y P22Ag mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés “Polymerase Chain Reaction”), el clonado en el vector plasmídico pET-32a(+) (Fig. 3.1) y la transformación de células de *E. coli* BL21 (DE3). En la presente se realizó la expresión y purificación de las proteínas recombinantes P35Ag y P22Ag.

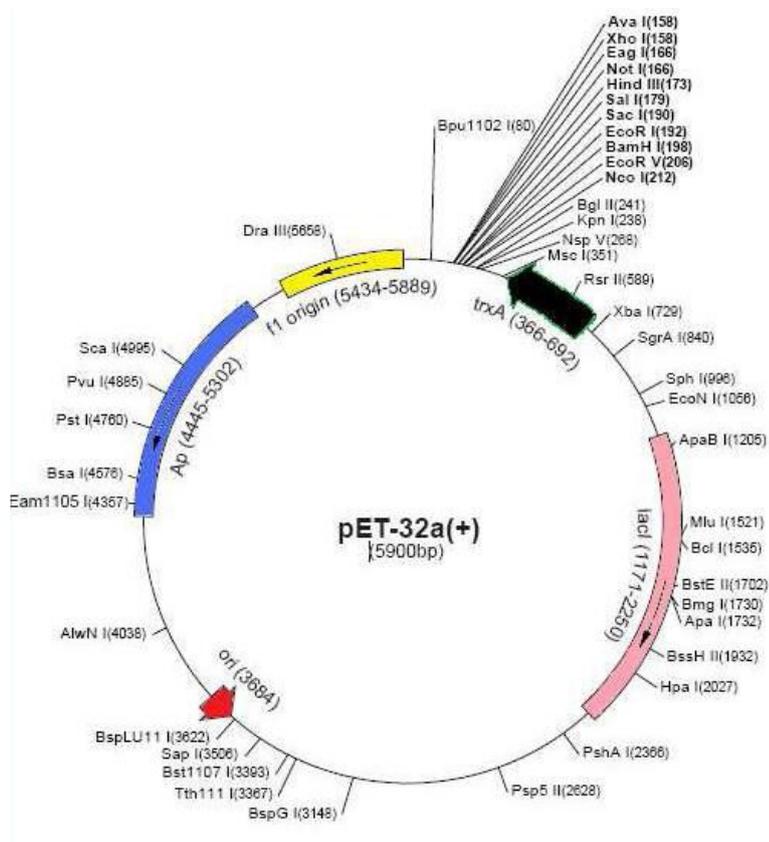


Figura 3.1. Vector pET-32a(+) utilizado para la clonación de las proteínas recombinantes.

3.2.3.1. Expresión de las Proteínas Recombinantes

La producción de una proteína foránea puede resultar tóxica para la bacteria huésped, por lo tanto la inducción de la expresión del gen recombinante debe producirse cuando las bacterias han alcanzado un determinado estado metabólico tal que esa toxicidad sea mínima.

El procedimiento consistió en hacer crecer “over-night” (ON) en agitación (180 rpm) a 37 °C las células de *E. coli* de la cepa BL21 (DE3), conteniendo las

distintas construcciones plasmídicas (pET-32a(+)/P35Ag o pET-32a(+)/P22Ag), en 2 mL de medio de cultivo LB suplementado con 0,1 mg/mL de ampicilina. En este paso se obtuvieron cultivos en fase estacionaria.

A continuación, se realizó un repique del cultivo obtenido en medio fresco (LB/ampicilina) y se incubó en las mismas condiciones por 3 hs aproximadamente. Cuando la absorbancia del medio de cultivo a 550 nm alcanzó un valor de 0,5-0,6, indicativo de que el crecimiento se encuentra en la fase exponencial, se agregó IPTG a una concentración final de 0,05 mM para inducir la expresión génica, y se continuó incubando ON a temperatura ambiente. Antes de realizar la inducción se tomó una muestra para realizar los controles necesarios.

Las células se recogieron centrifugando a 4.500 rpm durante 15 minutos, y se resuspendieron en buffer de resuspensión de células. La suspensión se sonicó hasta lisis total a 400 W, se centrifugó a 4.500 rpm durante 10 minutos para separar los restos celulares, y se recolectó el sobrenadante que contiene las proteínas solubles.

En la Fig. 3.2, se muestra un análisis por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), 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.

3.2.3.2 Purificación de las Proteínas Recombinantes

La separación cromatográfica de una biomolécula basada en la afinidad de proteínas por iones metálicos unido a agentes quelantes inmovilizados sobre un determinado soporte fue desarrollada en 1975 por Porath y col. Este método, denominado cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado (IMAC, del inglés “Immobilized-Metal Affinity Chromatography”), ha sido ampliamente utilizado en la separación de proteínas recombinantes (Lauritzen y col., 1991; Nilsson y col., 1992; La Vaille y col., 1993).



Figura 3.2. Imagen del gel de SDS-PAGE de clones de *E. coli* transformados con el plásmido pET-32a(+)/P35Ag. 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 P35Ag, como resultado del agregado de IPTG.

Durante el clonado del gen recombinante, se introduce una secuencia específica que permite fusionar un hexapéptido de residuos de Histidina (His) sobre el extremo N- o C-terminal de la proteína recombinante. La secuencia repetitiva de His posee gran afinidad por Ni, metal inmovilizado en las columnas cromatográficas. Las moléculas con estas características se conocen 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.

Las columnas de IMAC cuentan con un agente quelante inmovilizado al soporte cromatográfico, y a este agente se encuentra unido el Ni. Cuando la proteína recombinante circula por la columna, se forman quelatos estables entre el metal y los residuos de His. Tras la unión específica, estas proteínas pueden ser desplazadas por competencia con moléculas de imidazol (Fig. 3.3).

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 E1, E2, E3 y E4. 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 Coomasie.

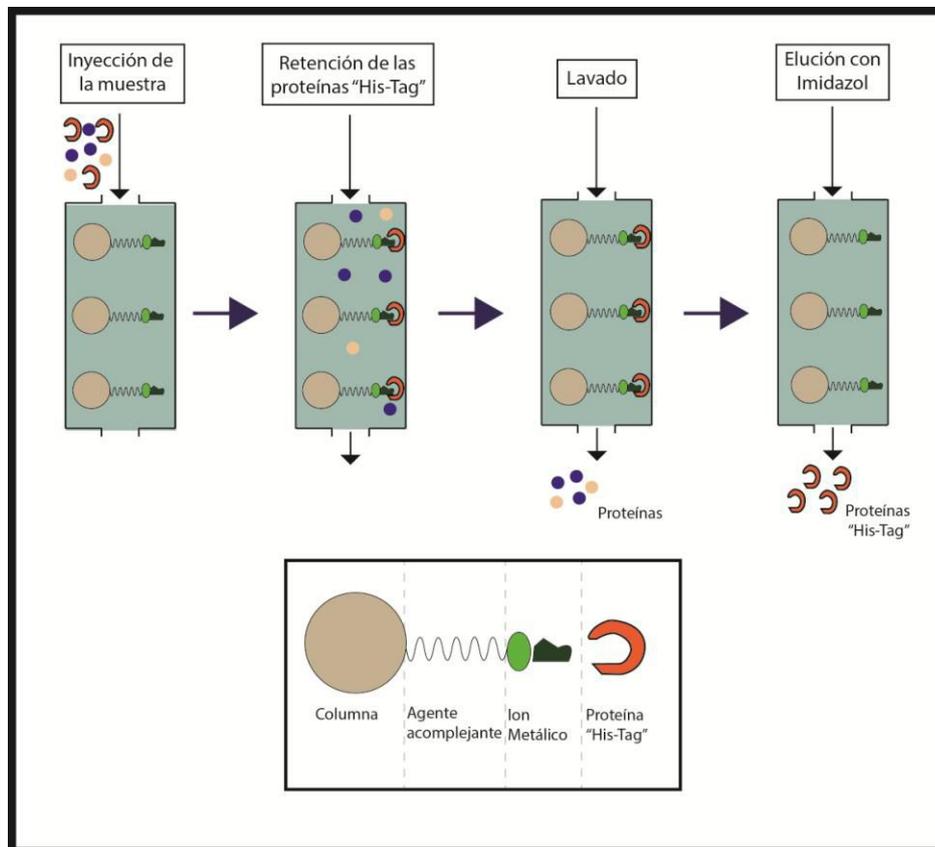


Figura 3.3. Proceso de purificación de las proteínas recombinantes en columnas de pseudoafinidad a Níquel.

3.2.3.3. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

La separación de moléculas cuando se aplica un determinado campo eléctrico se denomina electroforesis. La electroforesis en geles de poliacrilamida consiste en la separación de proteínas en función de su movilidad electroforética. La poliacrilamida posee características que resultan apropiadas para su uso como soporte en estos experimentos, ya que es termoestable, transparente, resistente y relativamente inerte. Además, se pueden preparar geles de poliacrilamida con un amplio rango de tamaños

medios de poro (Rüchel y col., 1978). El tamaño de poro de estos geles está determinado por las concentraciones de acrilamida y de agente reticulador (bisacrilamida) utilizadas; y su control permite adecuar la técnica al tamaño de la proteína a analizar.

Los geles presentan dos zonas: a) una con tamaño de poro grande (gel de apilamiento), de pH 6,8, 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), cuyo pH es de 8,8 y contiene glicerol de manera tal que en esta zona del gel las proteínas se separan de acuerdo a su tamaño (Fig. 3.4).

El gel de apilamiento ofrece poca resistencia a la mezcla de proteínas y es atravesado rápidamente. Cuando las proteínas se encuentran con el gel de resolución, aumenta la resistencia ejercida por el menor tamaño de poro y por la diferencia de pH, por lo que las proteínas retardadas pueden alcanzar al resto e inician la separación desde el mismo punto.

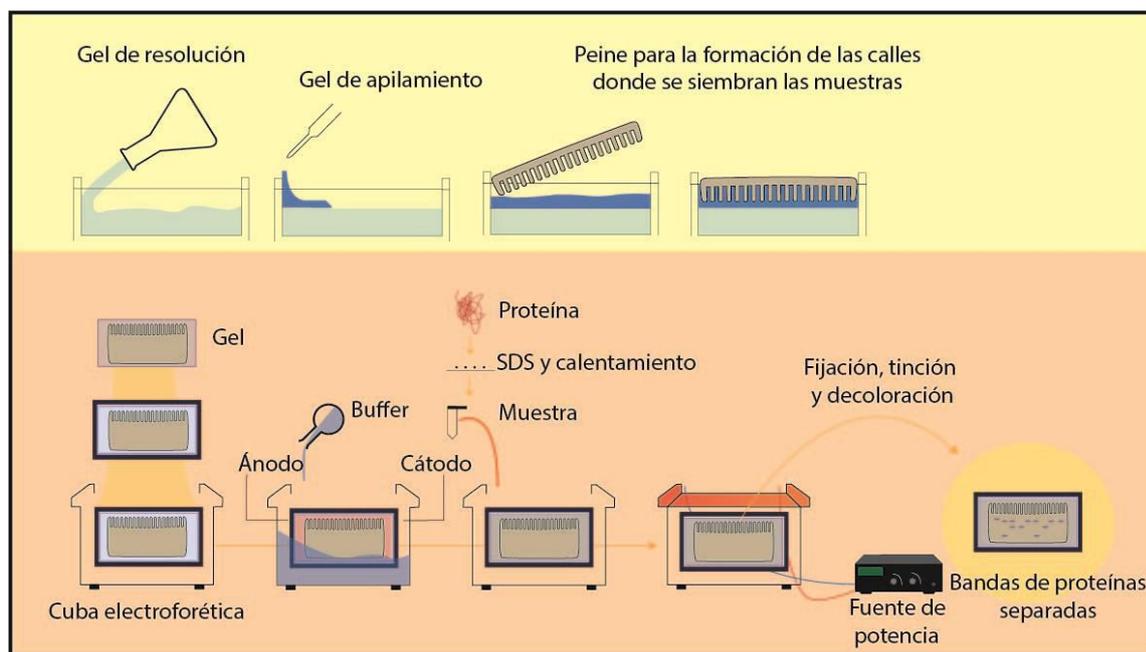


Figura 3.4. Representación esquemática de la preparación de un gel de poliacrilamida y de la electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE).

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida y la bisacrilamida en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se suele

utilizar el ión persulfato, que se añade en forma de persulfato de amonio (APS). Las aminas terciarias como el TEMED se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato. De esta manera, el sistema de iniciación es de tipo redox con APS como agente oxidante y TEMED como agente reductor.

En la presente Tesis, las electroforesis se llevaron a cabo en geles con un 15 % de acrilamida-bisacrilamida (relación másica 29:1), en condiciones desnaturizantes y reductoras (Laemmli, 1970). Las muestras se trataron con 1 volumen de buffer de muestra, conteniendo Tris-HCl pH 6,8, glicerol, SDS, β -mercaptoetanol y azul de bromofenol, y se incubaron en baño de agua a ebullición durante 5 minutos.

El surfactante SDS tiene como objetivo desnaturizar las proteínas, por lo que las mismas pierden su conformación tridimensional. Además cumple la función de aportar carga eléctrica negativa a cada proteína en proporción a su masa (Shapiro y col., 1967; Weber y col., 1969; Laemmli, 1970), de manera que la separación electroforética dependerá del peso molecular (PM) de la biomolécula y no de su carga intrínseca original.

El β -mercaptoetanol es un agente reductor que rompe los puentes di-sulfuro que pudieran existir en las biomoléculas, extendiendo así algunas formas de plegamiento terciario y rompiendo la estructura cuaternaria (subunidades oligoméricas).

En la preparación de las muestras se utiliza, además: i) Tris-HCl como buffer, porque es una sustancia inocua para la mayor parte de las proteínas; ii) glicerol, porque su densidad contribuye a que la muestra se deposite en las calles del gel, sin dispersarse en el buffer de corrida; y iii) azul de bromofenol, que actúa como marcador de avance del frente de corrida, porque al ser una molécula pequeña, se adelanta a la mayor parte de las proteínas.

Para realizar la electroforesis, se sembraron 15 μ L de cada muestra en el gel de poliacrilamida y se aplicó una diferencia de potencial de 200 V.

La fijación y tinción de los geles se efectuó por inmersión en solución de azul de Coomansie G-250, que se une a las proteínas de modo inespecífico, y se decoloró con las soluciones decolorantes I y II, mencionadas en el apartado 3.2.1.1.

En la Fig. 3.5 se muestra el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida tanto para el homogenato del *T. gondii*, como para las proteínas recombinantes P35Ag y

P22Ag. Puede observarse que el homogenato del parásito obtenido es una mezcla de proteínas de distintos PM y concentraciones; mientras que ambas proteínas recombinantes se encuentran puras y el PM de cada una se encuentra en el orden esperado según el PM teórico: 29,7 kDa para P35Ag y 35,2 kDa para P22Ag.

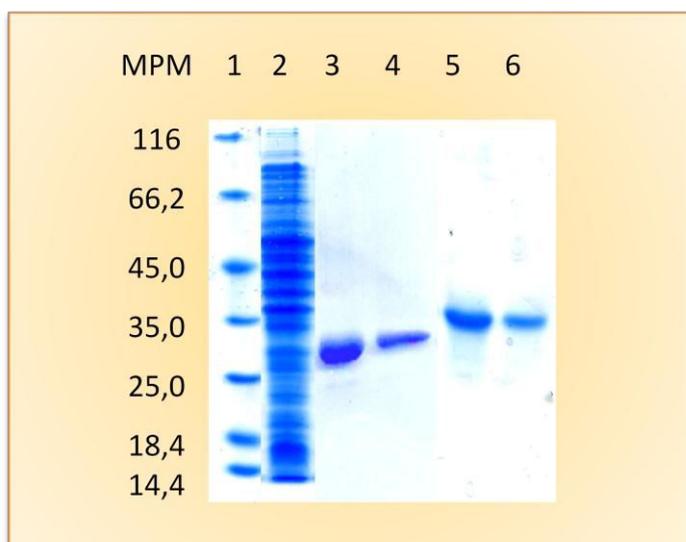


Figura 3.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE). Calle 1: Marcador de Pesos Moleculares (kDa), calle 2: homogenato del *T. gondii*, calles 3 y 4: P35Ag, calles 5 y 6: P22Ag. Imagen modificada para su presentación.

3.2.3.4. Cuantificación de las Proteínas Recombinantes

La cuantificación de las proteínas obtenidas se realizó en base a una curva de calibrado construida con patrones de BSA, como proteína modelo. Se realizó un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), donde se sembraron soluciones con concentraciones conocidas de BSA junto con las fracciones de la proteína de interés, previamente obtenidas de la columna de purificación. Los geles se analizaron utilizando el programa “Gel-Pro Analyzer” versión 3.1 (Gong y col., 2003), que permite medir y automatizar los procesos de obtención de datos en distintos tipos de geles, relacionando la intensidad de la imagen con la concentración de la proteína sembrada.

En la Fig. 3.6 se muestran los resultados de la purificación de la proteína recombinante P22Ag, conjuntamente con una serie de muestras de BSA de concentraciones conocidas, que se utilizaron para construir la curva de calibrado de la Fig. 3.7. La mayor parte de la proteína eluyó purificada a partir de la solución E3, que contiene 250 mM de imidazol.

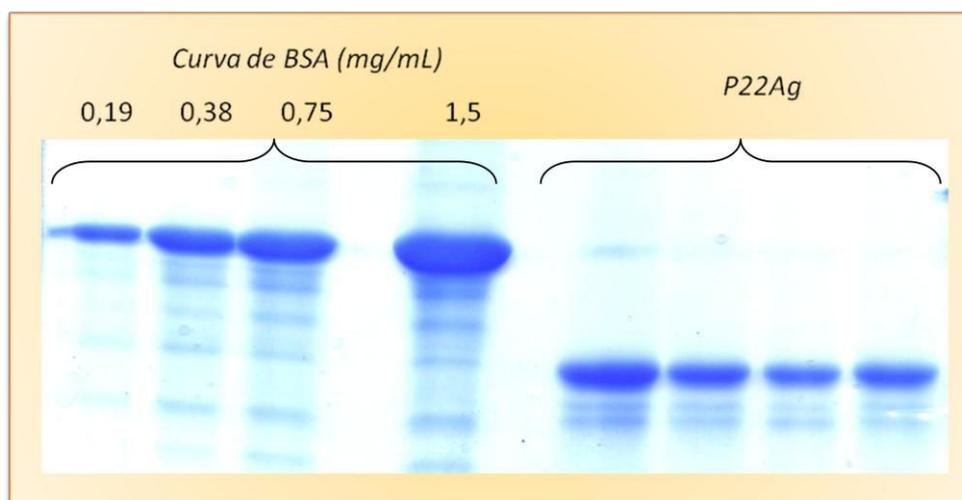


Figura 3.6. Resultado de SDS-PAGE obtenido al sembrar las distintas fracciones de 250 mM de imidazol recolectadas en la purificación de la proteína P22Ag, junto con una serie de muestras de BSA de concentraciones conocidas.

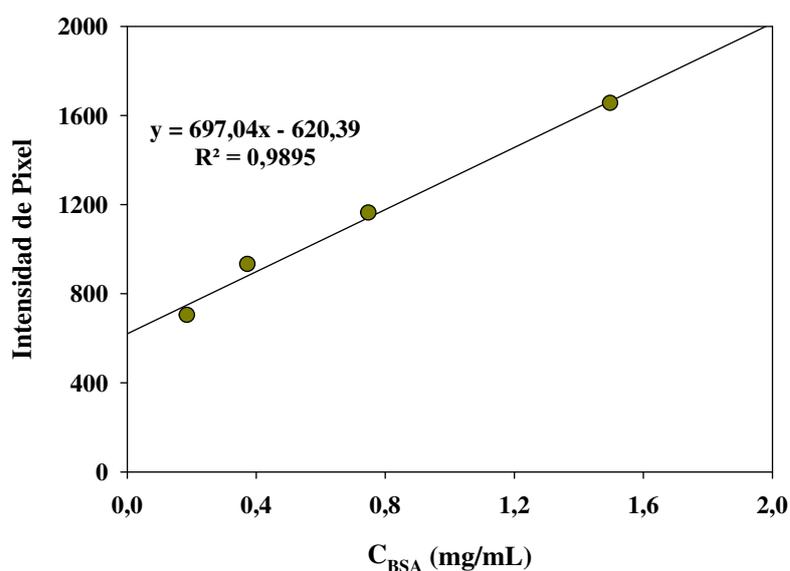


Figura 3.7. Curva de calibrado de BSA. Intensidad de pixel obtenida por el Software “Gel-Pro Analyzer” luego del procesamiento de la imagen del gel de poliacrilamida de la Fig. 3.6.

La curva de calibrado de BSA se construyó graficando la intensidad de pixel obtenida vs. la concentración de BSA sembrada (C_{BSA}). Los puntos experimentales se ajustaron mediante una regresión lineal y la función obtenida se utilizó para calcular los valores de concentración de P22Ag en base a la intensidad de pixel registrada.

3.2.4. Caracterización de las Proteínas Recombinantes Utilizadas

Se determinó el punto isoelectrico (pI) experimental de las proteínas recombinantes P35Ag y P22Ag por isoelectroenfoque. Esta técnica consiste en realizar una electroforesis sobre un gel construido con gradiente de pHs. Así, la carga eléctrica de las proteínas varía a medida que transcurre la electroforesis y la migración se produce hasta que la proteína tenga carga neta igual a cero. El pH donde la proteína se detiene es el pI experimental.

Además, en base a la secuencia de aminoácidos (AA) de las proteínas obtenidas, se procedió a la estimación de sus propiedades mediante distintos “software” informáticos. Así, el pI teórico, el número de AA y el PM se determinaron empleando el programa “ExpASy ProtParam Tool” (Gasteiger y col., 2003). Estas características son útiles si se desea conocer en forma aproximada la región donde se puede encontrar una proteína en un gel de poliacrilamida (según su PM) y el pH aproximado en que la proteína tendrá carga neta cero (pI).

Finalmente, se calculó el radio de giro cuadrático medio (Rg) en vacío utilizando el programa “g_gyrate” del paquete informático “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.

Las principales características obtenidas para los Ag recombinantes P35Ag y P22Ag se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Principales características de los antígenos recombinantes P35Ag y P22Ag.

	P35Ag	P22Ag
Nº de aminoácidos	278	335
Punto isoeléctrico teórico	5,94	5,86
Punto isoeléctrico experimental	6,27	6,33
Peso molecular teórico (kDa)	29,7	35,2
Radio de giro teórico (nm)	2,88	2,83

El programa “ExPASy ProtParam Tool” calculó el pI teórico utilizando los valores de pK de los aminoácidos reportados en Bjellqvist y col. (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.

El PM de la proteína se calculó mediante la adición de masas isotópicas medias de AA 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 en un gel a una posición muy diferente de la prevista.

La estructura tridimensional 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 (Zhang 2007). Este servidor, realiza un procedimiento bioinformático donde se produce la identificación de la proteína de interés a partir de bases de datos generadas con 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. La simulación se basó en conocimientos previos tales como: i) términos estadísticos generales derivados de “Protein Data Bank” (Berman y col., 2000), correlaciones carbono central/cadena lateral (Zhang, 2007), uniones puente de hidrógeno (Zhang y col., 2006) e hidrofobicidad (Chen y col., 2005); ii) restricciones espaciales (Wu y Zhang, 2007) y iii) predicciones de contacto basados en secuencias (Wu y Zhang, 2008). En la Fig. 3.8 se muestran los modelos de estructura predichos por el servidor I-TASSER para P35Ag y P22Ag.

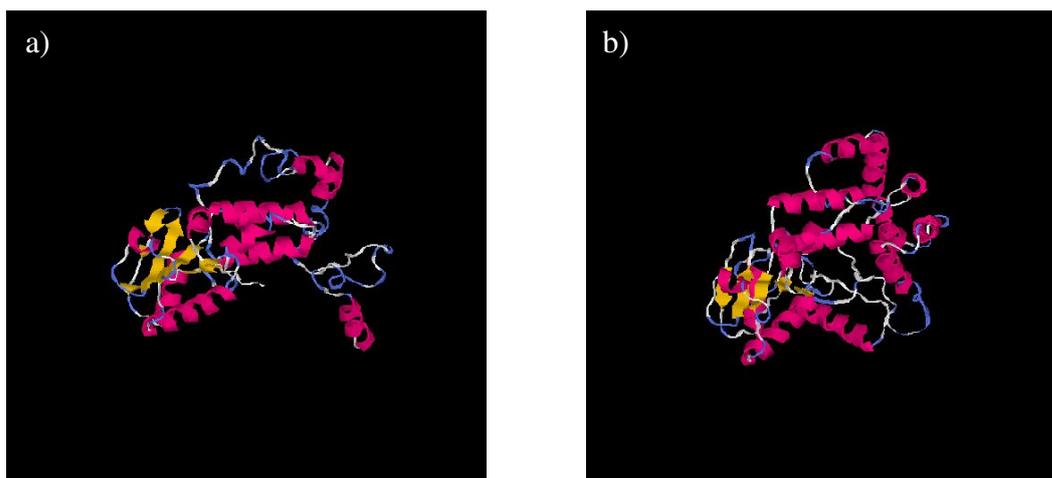


Figura 3.8. Estructura de las proteínas recombinantes P35Ag (a) y P22Ag (b) predichas por el servidor I-TASSER.

Se pueden observar las principales estructuras conformacionales que adoptan las proteínas: en color magenta se observan las hélices α , en color amarillo las hojas β , en color azul los “loops” y en gris se representan regiones irregulares.

3.2.5. Evaluación de la Antigenicidad de las Proteínas Obtenidas

La capacidad antigénica de las proteínas obtenidas puede verse alterada durante el proceso de purificación. Por ello, antes de que sean empleadas para sensibilizar las partículas de látex, es necesario comprobar su antigenicidad, es decir la capacidad de ser reconocidas por Ac específicos.

Se realizaron ensayos de ELISA sensibilizando los pocillos con el homogenato del *T. gondii* y con los Ag recombinantes (P35Ag y P22Ag), y se enfrentaron a un panel de sueros. Estos sueros fueron provistos por el Laboratorio Central de la Provincia de Santa Fe, donde se clasificaron por técnicas de referencia según el protocolo que se muestra en la Fig. 3.9.

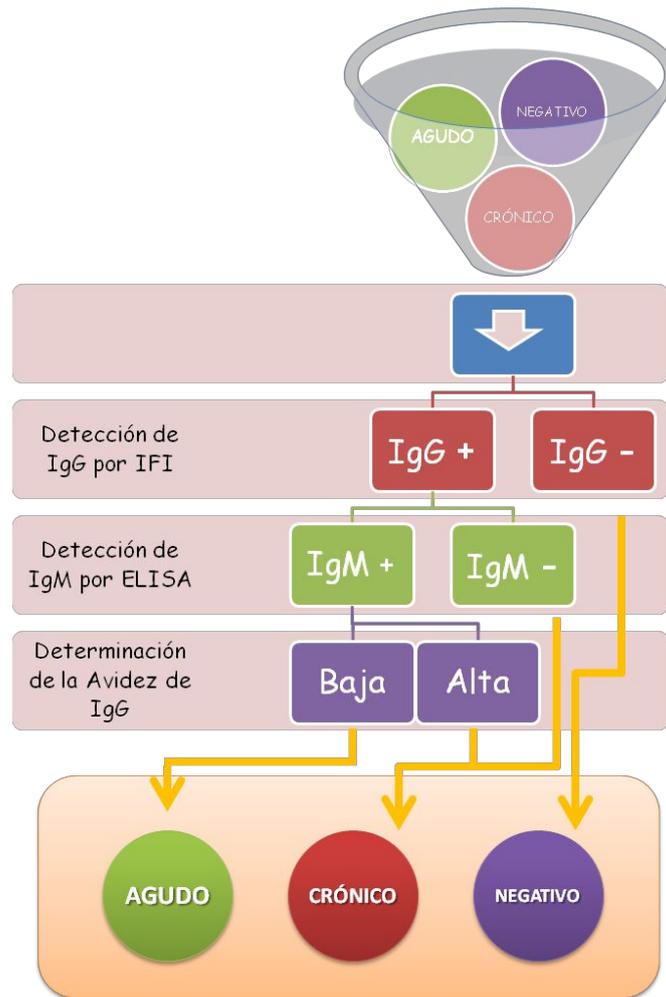


Figura 3.9. Esquema de protocolo seguido para la clasificación de los sueros mediante técnicas de referencia. IFI: Inmunofluorescencia Indirecta.

Los sueros se clasificaron en 3 grupos:

- i) “Negativos”, los que resultaron negativos para IgG (8 sueros).
- ii) “Agudos”, los que fueron positivos tanto para IgG como para IgM y para los que el ensayo de avidéz mostró baja afinidad de las IgG, lo que es indicativo que el tiempo de infección es menor a 4 meses (8 sueros).
- iii) “Crónicos”, los que fueron positivos para IgG y negativos para IgM, o bien positivos para IgM pero con afinidad alta de IgG, lo que es indicativo que las IgM detectadas no son recientes (8 sueros).

Para realizar el ensayo de ELISA, se utilizó el procedimiento esquematizado en la Fig. 3.10. Para ello, a) las policubetas de microtitulación (Costar) fueron sensibilizadas mediante el agregado de 0,5 µg/pocillo de cada Ag en buffer carbonato pH 9,6; b) los sitios hidrofóbicos libres 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 (Ac anti-IgG humana marcados con peroxidasa de rábano, Zymed) diluido 1/2000 en PBS-leche descremada 1 %; e) se agregó el revelador, consistente en una mezcla del sustrato enzimático y el cromógeno TMB ($H_2O_2/3,3',5,5'$ -tetrametilbenzidina, RDI); f) la reacción de color fue bloqueada luego de 15 minutos con H_2SO_4 0,5 N. Entre cada una de las etapas, se realizaron incubaciones a 37 °C por 60 minutos y posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0,05 %. Las lecturas de la densidad óptica (DO), es decir la absorbancia por unidad de distancia, de cada pocillo se efectuaron a 450 nm en lector de ELISA, donde la intensidad de color es proporcional a la concentración de Ac en la muestra. Cada determinación fue realizada por duplicado. En las Figs. 3.11 a 3.13 se muestran los resultados de los ensayos de ELISA.

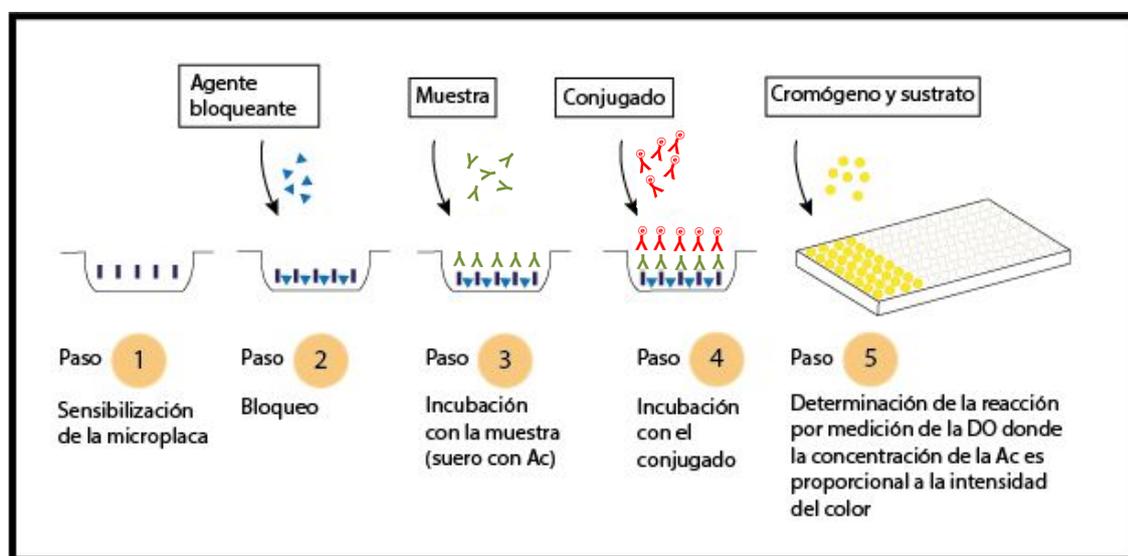


Figura 3.10. Procedimiento para determinar la capacidad antigénica de las proteínas recombinantes mediante ELISA.

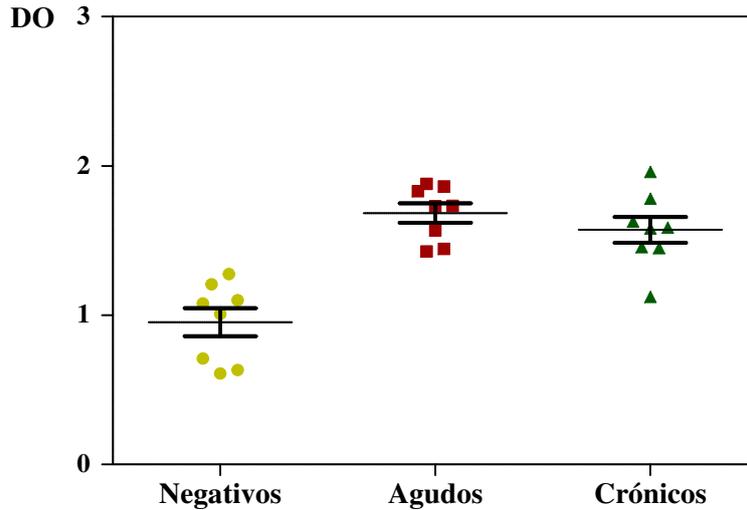


Figura 3.11. Antigenicidad del homogenato del *T. gondii*. Densidad óptica (DO) a 450 nm obtenida al enfrentar el homogenato con sueros negativos, agudos y crónicos en ensayos de ELISA.

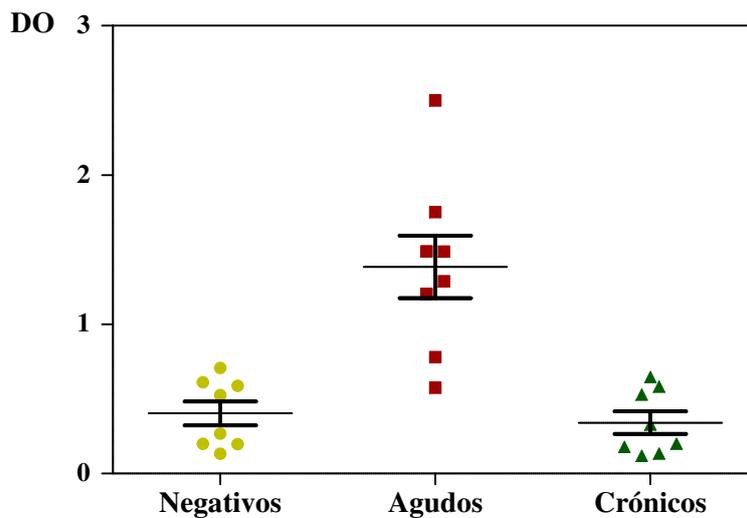


Figura 3.12. Antigenicidad del antígeno recombinante P35Ag. Densidad óptica (DO) a 450 nm obtenida al enfrentar P35Ag con sueros negativos, agudos y crónicos en ensayos de ELISA.

Se puede observar que el homogenato del parásito presentó valores de DO similares para los sueros agudos y crónicos, indicando que esta mezcla indefinida de proteínas no permitiría la diferenciación de las distintas fases de la enfermedad. En cambio, los Ag recombinantes fueron capaces de discriminar los sueros agudos respecto de los crónicos y negativos, presentando mayores valores de DO para los sueros

provenientes de una infección reciente. Por lo tanto, P35Ag y P22Ag son Ag apropiados para ser utilizados en la sensibilización de las partículas de látex, con el objetivo final de producir un reactivo de inmunoaglutinación capaz de detectar Toxoplasmosis recientemente adquirida.

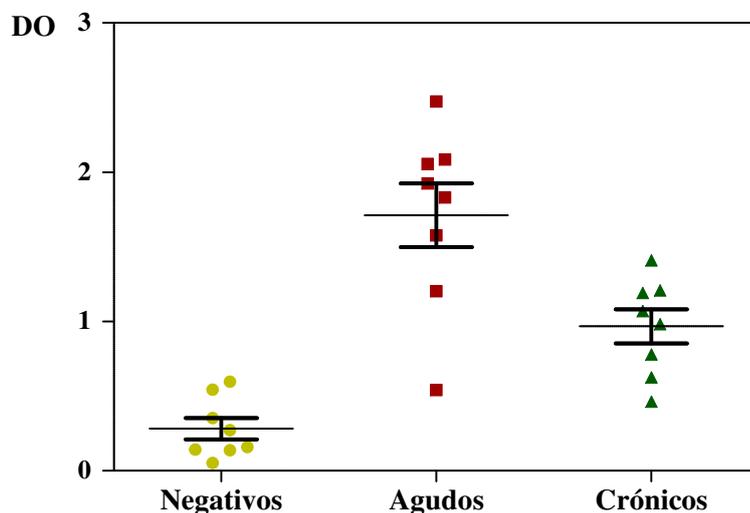


Figura 3.13. Antigenicidad del antígeno recombinante P22Ag. Densidad óptica (DO) a 450 nm obtenida al enfrentar P22Ag con sueros negativos, agudos y crónicos en ensayos de ELISA.

3.3. CONCLUSIONES

En este capítulo se obtuvieron y caracterizaron los Ag que posteriormente se utilizarán en la sensibilización de las partículas de látex.

Se obtuvo el homogenato del *T. gondii* a partir de exudado peritoneal de ratones infectados y se constató mediante SDS-PAGE que el mismo está compuesto por una mezcla compleja de proteínas de diferentes pesos moleculares. Además, se expresaron y purificaron los Ag recombinantes P35Ag y P22Ag, los cuales presentaron puntos isoeléctricos y PM bien definidos y relativamente cercanos, con un PM algo menor para P35Ag. Finalmente, los Rg de ambos Ag resultaron similares.

Tanto P35Ag como P22Ag se obtuvieron con un alto grado de pureza y con una adecuada concentración, siendo posible de este modo su uso en la sensibilización de las partículas de látex.

La antigenicidad de las proteínas obtenidas se evaluó mediante ELISA. Los resultados obtenidos mostraron que ambas proteínas recombinantes poseen mayor especificidad para Ac de fase aguda, presentes en los sueros de pacientes con Toxoplasmosis recientemente adquirida. De esta manera, las proteínas recombinantes sintetizadas pueden ser utilizadas en el desarrollo de látex biofuncionales, con potenciales aplicaciones para el diagnóstico de la fase aguda de la Toxoplasmosis.

CAPÍTULO 4:

Obtención de Complejos Látex-Proteína

4.1. INTRODUCCIÓN

Luego de haber sintetizado y caracterizado látex de diversos tamaños, tipos de grupos superficiales y densidades de carga superficial, y de haber obtenido los antígenos (Ag) recombinantes y el homogenato del *T. gondii*, se realizó el acoplamiento de los Ag obtenidos sobre la superficie de las partículas poliméricas para obtener complejos látex-proteína (CLP).

Cuando las moléculas de proteínas se acercan a la superficie de las partículas, en determinadas condiciones experimentales, se producen distintas interacciones que pueden ser electrostáticas, hidrofóbicas, de Van der Waals, uniones puente hidrógeno, o uniones covalentes entre grupos reactivos apropiados. La unión de las proteínas a la superficie de las partículas se puede realizar a través de 2 mecanismos: adsorción física (AF) y unión covalente (UC).

El proceso de AF de proteínas ocurre cuando una solución de proteínas se pone en contacto con una fase sólida y tienen lugar interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, de Van der Waals y/o puente hidrógeno. Una vez que la biomolécula se encuentra sobre la superficie, la interacción puede optimizarse a través de la relajación de la proteína, aumentando el número de contactos proteína-superficie. Esta relajación, normalmente involucra rearrreglos estructurales o cambios conformacionales en la biomolécula, que podrían ocasionar una disminución en la actividad biológica. Ésta puede hacer que los sitios activos de la molécula puedan verse comprometidos en la interacción con la superficie, lo que afectaría el reconocimiento antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) durante el inmunoensayo.

Además, estas interacciones son parcialmente reversibles y por lo tanto dependientes de las condiciones de almacenamiento y del paso del tiempo. La proteína

se puede desorber de la superficie por dilución, por cambios en el pH o en la fuerza iónica (FI), por desplazamiento por compuestos de bajo peso molecular (PM), o por intercambio con las moléculas de la solución (Norde y Giacomelli, 1999). También puede ocurrir que algunas moléculas no se desorban totalmente, pero sí 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. Buena parte de dichos inconvenientes pueden eliminarse si la proteína se une covalentemente a la superficie de las partículas del látex.

La UC de proteínas cuenta con varias ventajas respecto de la AF. En este caso, la inmunoreactividad del Ag o Ac unido se mantiene en el tiempo, porque ocurre una mínima desnaturalización en la superficie y por la ausencia de desorción. Además, la unión es más fuerte, estable y se puede inducir una orientación preferencial de la proteína sobre la superficie. Para el acoplamiento covalente de las proteínas, se emplean látex hidrofílicos funcionalizados de tamaño de partícula y densidad de grupos funcionales uniformes. La naturaleza hidrofílica aumenta la estabilidad de los CLP, y previene interacciones inespecíficas (Elwing y col., 1988). La uniformidad en el tamaño y la densidad de grupos funcionales aumenta la estabilidad coloidal y permite una distribución homogénea de las proteínas sobre la superficie de las partículas. La unión de las proteínas es fuertemente afectada por el medio; y la FI o el pH pueden afectar la cantidad de proteína unida (Bale y col., 1989).

En este Capítulo, se estudió la sensibilización (o formación de los CLP) mediante AF y UC de las distintas proteínas antigénicas del *T. gondii* (proteínas recombinantes y el homogenato del parásito) obtenidas previamente en el Capítulo 3.

Se realizaron experimentos de AF de las proteínas antigénicas del *T. gondii* sobre látex de poliestireno (PS) y con funcionalidad carboxilo, donde se investigó el efecto del tamaño de partícula y del tipo de superficie del látex sobre la cantidad de proteína adsorbida por unidad de área superficial. En los experimentos de UC se analizaron las condiciones más apropiadas para la unión de las proteínas antigénicas sobre los distintos soportes poliméricos. En el caso de los látex con funcionalidad carboxilo, se evaluó la influencia del pH del medio de reacción, la concentración de proteína adicionada y la densidad de carga superficial sobre la cantidad de proteína unida, procurando establecer las características más adecuadas para el desempeño posterior de los CLP en la

detección de Toxoplasmosis recientemente adquirida. En el caso de los látex epoxidados se estudió el efecto de la FI del medio y del tiempo de incubación sobre la reacción de acoplamiento.

Los CLP obtenidos fueron caracterizados, determinándose los diámetros medios por dispersión de luz dinámica (DLS, del inglés “Dynamic Light Scattering”) a 90° y a múltiples ángulos (MDLS), entre 50° y 120°. La estabilidad de los CLP se analizó mediante la determinación de la concentración crítica de coagulación (c.c.c.) medida por el método visual y por DLS, y la medición de la movilidad electroforética (μ_e) y del potencial Zeta (ζ). Finalmente, se realizaron ensayos de ELISA para evaluar si la proteína anclada a la superficie de las partículas conservó su capacidad antigénica luego del proceso de sensibilización.

4.2. TRABAJO EXPERIMENTAL

4.2.1. Adsorción Física

Se llevaron a cabo sensibilizaciones pasivas de los 3 Ag obtenidos sobre 2 látex de PS (S8 y S10) y 4 látex carboxilados (S8C1, S8C2, S10C1 y S10C2). Las mismas se realizaron en buffer fosfato pH 6, cercano a los puntos isoeléctricos (pI) de las proteínas recombinantes, empleando una concentración inicial de proteína de 0,6 mg/mL. En el pI, las proteínas tienen carga neta igual a cero. En estas condiciones se ven disminuidas las repulsiones intermoleculares (entre moléculas de proteínas vecinas) e intramoleculares (dentro de la misma molécula de proteína). Además de estos dos efectos, también se ven disminuidas las repulsiones entre las proteínas y la superficie de las partículas, lo cual favorece la adsorción. La FI final en todos los casos fue de 2 mM.

Los ensayos consistieron en mezclar una determinada cantidad de látex (superficie 0,2 m²) con el buffer y las distintas proteínas, dejando el sistema en agitación suave durante 5 h a temperatura ambiente. Se realizó también un blanco de látex para restar toda lectura de absorbancia (A) que no corresponda a la proteína que se desea detectar. Los CLP obtenidos se centrifugaron durante 30 minutos a 10.000 rpm (7200×g) y 10 °C

en una centrífuga refrigerada Neofuge 18R (Heal Force). Las concentraciones de proteínas presentes en cada sobrenadante se determinaron mediante el método del ácido bicinconínico (BCA, Pierce). Los CLP se redispersaron en buffer borato (Anedra) 2 mM, pH 8, y 0,1 mg/mL de azida sódica (N_3Na), para su almacenamiento y posterior utilización en los ensayos de inmunoaglutinación (IA).

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 teniendo en cuenta el diámetro medio de los látex obtenidos por DLS a 90° y considerando que las partículas son monodispersas.

La Fig. 4.1 muestra una representación esquemática de los experimentos de AF y en la Fig. 4.2 se presenta la cantidad de P35Ag y P22Ag adsorbida por unidad de área superficial sobre los distintos látex estudiados (Γ_{Prot} , mg/m^2).

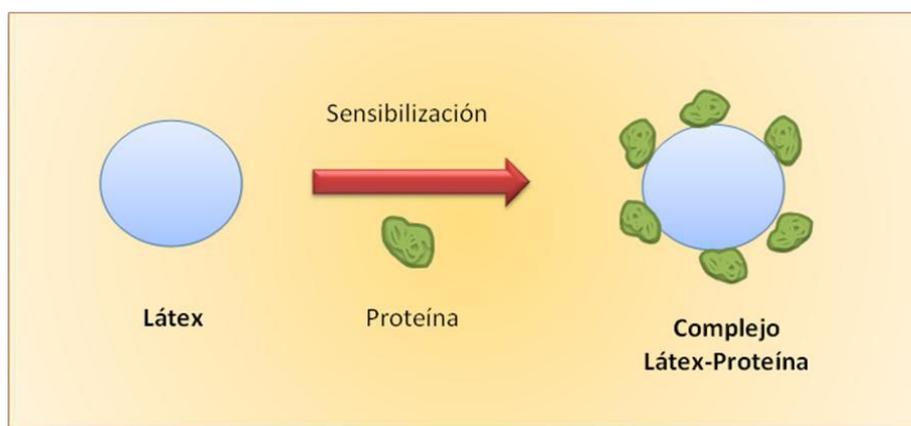


Figura 4.1. Representación esquemática del proceso de sensibilización de partículas de látex por adsorción física.

En las condiciones ensayadas, y para los tamaños de partícula, proteínas y concentraciones analizadas, no se pudo observar un efecto significativo del tamaño de las partículas sobre la cantidad de proteína adsorbida. En cambio, el tipo de látex (PS o carboxilado) tuvo una clara influencia en el proceso de adsorción. Para ambas proteínas recombinantes, se observó el mismo comportamiento: la cantidad de proteína adsorbida fue mayor sobre los látex de PS, y fue menor sobre los látex carboxilados con mayor densidad de grupos funcionales superficiales. Estos resultados podrían estar indicando

que la interacción entre las proteínas y la superficie del látex estaría gobernada por fuerzas hidrofóbicas.

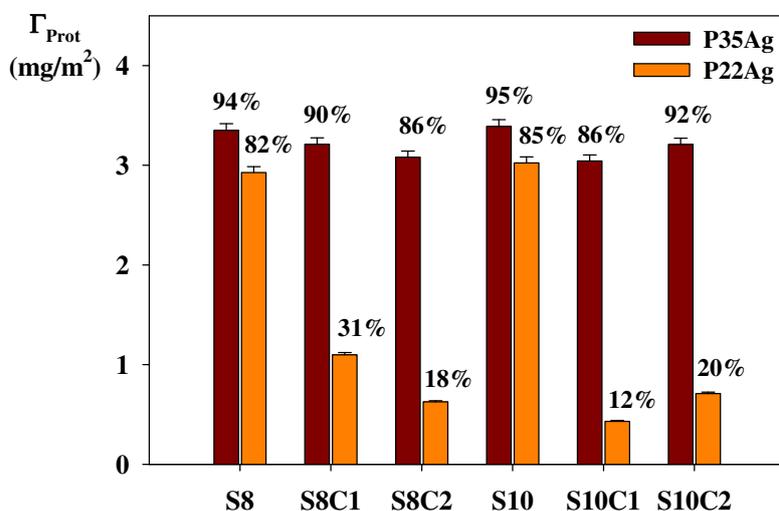


Figura 4.2. Adsorción física de las proteínas recombinantes P35Ag y P22Ag sobre 2 látex de poliestireno (S8 y S10) y 4 látex carboxilados (S8C1, S8C2, S10C1 y S10C2). Los porcentajes en las barras indican la fracción de proteína adsorbida respecto a la adicionada y las barras de error indican la desviación estándar para $n = 3$.

También se observó que la proteína P35Ag se unió en mayor cantidad que la P22Ag en todos los casos. Una posible explicación a este comportamiento podría encontrarse en la composición aminoacídica de las proteínas: en P35Ag los aminoácidos (AA) no polares o hidrófobos (alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina) representan el 52,8 % del total de AA, mientras que en P22Ag la fracción hidrófoba corresponde al 39,9 %. De esta manera, la mayor hidrofobicidad de la proteína recombinante P35Ag podría estar favoreciendo las interacciones con la superficie de las partículas.

En la Fig. 4.3 se presentan los resultados de AF para las 2 proteínas recombinantes y para el homogenato del *T. gondii* sobre los látex de PS S8 y S10. Las cantidades de proteína adsorbida en los experimentos realizados con el homogenato del parásito fueron menores que aquellas observadas en los ensayos con proteínas recombinantes, y esto podría estar relacionado a la composición compleja del mismo,

que corresponde a una mezcla de proteínas de diferentes tamaños, pI, composición aminoacídica y afinidades por la superficie de las partículas.

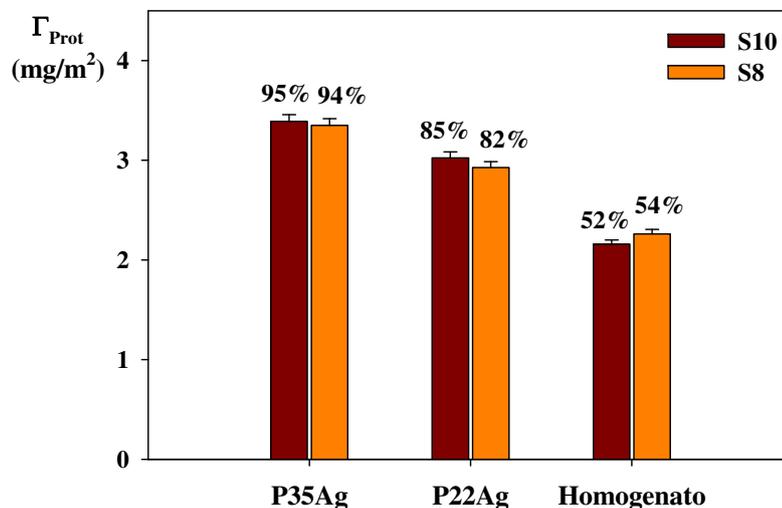


Figura 4.3. Adsorción física de las proteínas recombinantes P35Ag y P22Ag, y del homogenato del *T. gondii* sobre 2 látex de poliestireno (S8 y S10). Los porcentajes sobre las barras indican la fracción de proteína adsorbida respecto a la adicionada y las barras de error indican la desviación estándar para $n = 3$.

4.2.1.1. Efecto de la Presencia de Emulsificante sobre la Adsorción Física

Se evaluó el efecto de la presencia del emulsificante MA-80 en la AF de P35Ag sobre las partículas del látex S10. Se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente sobre una muestra del látex de PS S10 que fue lavada parcialmente, conservando una fracción de emulsificante. En la Fig. 4.4 se presentan los resultados de AF de P35Ag sobre el látex S10, con y sin emulsificante. Como se esperaba, la presencia de MA-80 provocó una disminución en la cantidad de proteína adsorbida sobre la superficie de la partícula. Mientras que en el látex S10 sin MA-80 el porcentaje de proteína unida respecto a la adicionada fue del 95 %, en el látex S10 en presencia emulsificante este porcentaje disminuyó al 57 %. Evidentemente, las moléculas de MA-80 compitieron con las de proteína por la superficie de las partículas.

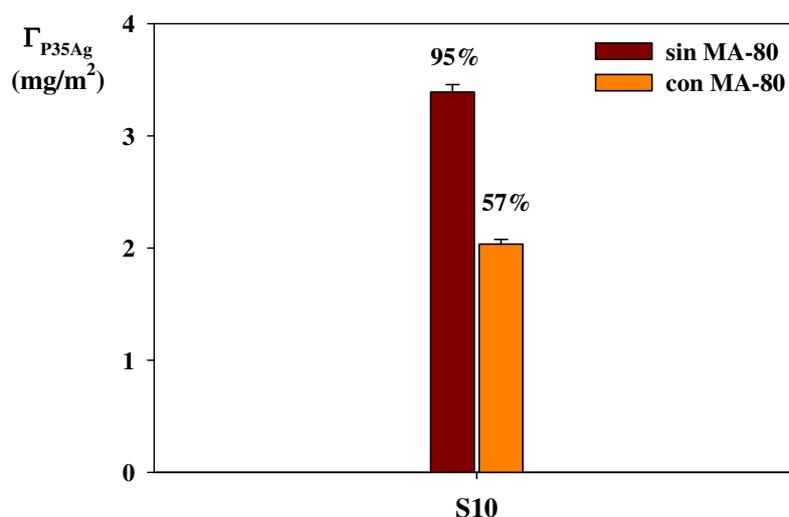


Figura 4.4. Adsorción física de P35Ag sobre el látex S10, con y sin emulsificante MA-80. Los porcentajes sobre las barras indican la fracción de proteína adsorbida respecto de la adicionada y las barras de error indican la desviación estándar para $n = 3$.

4.2.2. Unión Covalente sobre Partículas con Funcionalidad Carboxilo

Se realizaron experimentos tipo “batch” a temperatura ambiente, mezclando en tubos eppendorf de 1,5 mL las partículas de látex con funcionalidad carboxilo (superficie 0,2 m²), el activador de los grupos carboxilo N-N-(3-dimetilaminopropil)N'-etilcarbodiimida (EDC), el buffer fosfato (FI final 2 mM) y cantidades crecientes de proteína recombinante ($C^{\circ} = 0,3-0,9$ mg/mL). Cuando se empleó el homogenato del parásito, la concentración inicial de proteína fue fija ($C^{\circ} = 0,6$ mg/mL). En el caso de P35Ag, se realizaron ensayos a 3 pHs (5, 6 y 7), mientras que en el caso de P22Ag y del homogenato, el buffer empleado fue de pH 6. Para cada experimento se preparó un tubo blanco, el cual no contenía proteína. La solución de EDC (15 mg/mL) se preparó justo antes de emplearla, para evitar su descomposición. La cantidad de EDC agregada fue aproximadamente 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 y posteriormente se realizaron centrifugaciones a 10.000 rpm ($7200\times g$) y $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. La proteína presente en el sobrenadante se cuantificó por el método del BCA. La cantidad total de proteína unida a la superficie de las partículas, que incluye tanto a la unida covalentemente como a la adsorbida físicamente, se determinó mediante un balance de masa (Turková, 1999).

Para evitar los problemas asociados a la presencia de proteína adsorbida físicamente durante el inmunoensayo, los látex sensibilizados se trataron con un emulsificante capaz de eliminar la proteína adsorbida (Kapmeyer y col., 1988; Peula y col., 1995). Para ello, los CLP 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 CLP se redispersaron, con la ayuda de ultrasonido, en buffer borato pH 8 para su almacenamiento.

La cantidad de proteína unida luego de la desorción con Tritón X-100 se calculó por diferencia entre la proteína total unida y la que permanece en el sobrenadante luego de este proceso. Cabe destacar que el uso de un emulsificante débil como Tritón X-100 responde al objetivo de mantener inalterada la conformación de las proteínas, ya que el empleo de un emulsificante más fuerte podría causar desnaturalizaciones que alteren el comportamiento del reactivo en los ensayos de IA. La Fig. 4.5 muestra un esquema del proceso de sensibilización por UC de proteínas sobre partículas de látex carboxiladas.

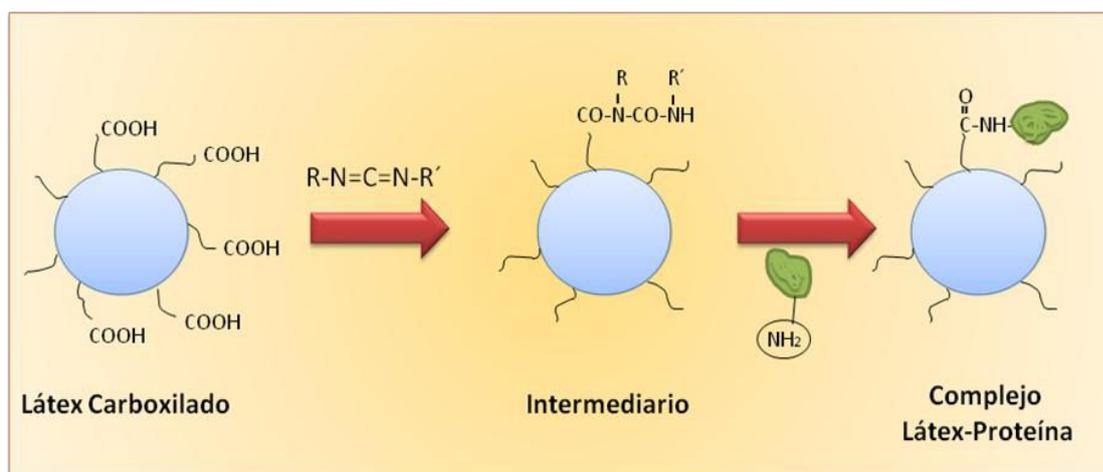


Figura 4.5. Esquema del proceso involucrado en la unión covalente de las proteínas con los grupos carboxilo superficiales activados por una carbodiimida soluble.

Los resultados de la UC del Ag recombinante P35Ag sobre los látex carboxilados S8C1, S8C2, S10C1 y S10C2 a diferentes pHs se muestran en las Figs. 4.6 y 4.7. Se representa la cantidad de proteína unida sobre las partículas carboxiladas (Γ_{P35Ag} , mg/m^2) en función de la concentración inicial de proteína (C°_{P35Ag} , mg/mL). Las densidades de proteína total unida a la superficie de las partículas (barras oscuras) se comparan con las de proteína unida luego del proceso de desorción ($\Gamma_{P35Ag, cov}$, mg/m^2) con Tritón X-100 al 1 % (barras claras).

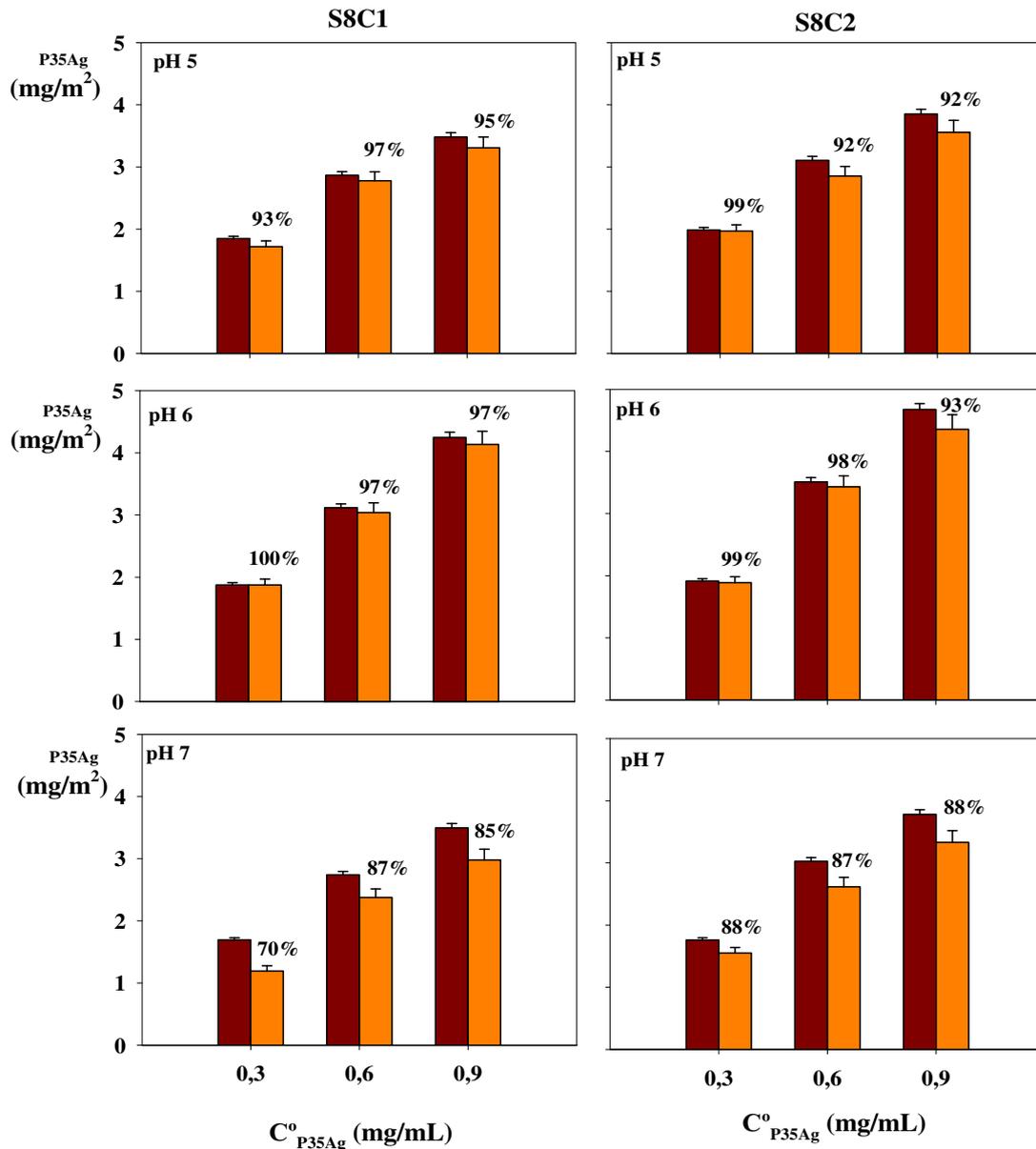


Figura 4.6. Acoplamiento químico de P35Ag sobre los látex carboxilados S8C1 y S8C2 en función de la cantidad de proteína inicial a pH 5, 6 y 7. La densidad de proteína unida total (barras oscuras) es comparada con la unida luego de la etapa de desorción con Tritón X-100 (barras claras). Los porcentajes sobre las barras indican la fracción de proteína unida covalentemente y las barras de error indican la desviación estándar para $n = 3$.

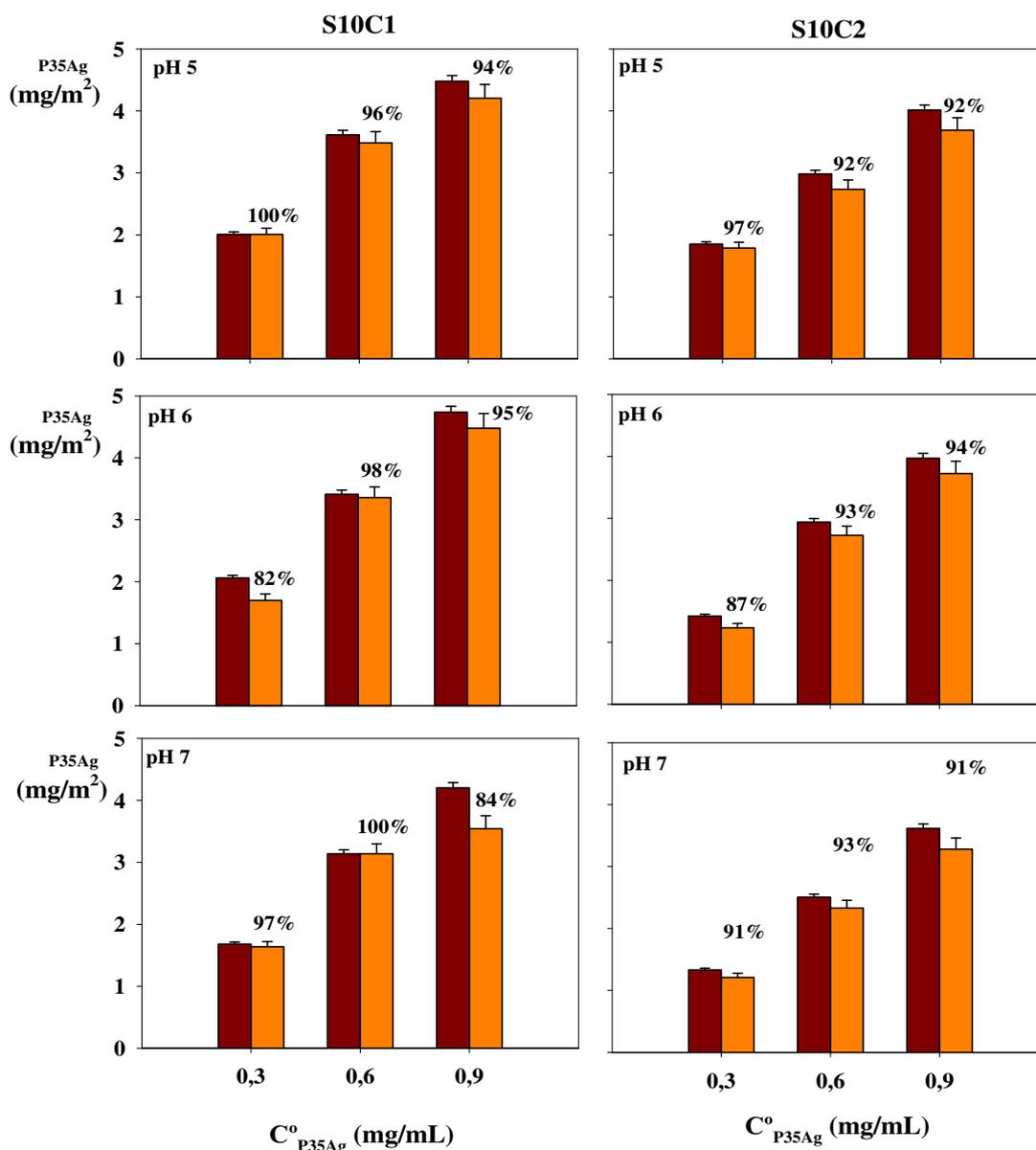


Figura 4.7. Acoplamiento químico de P35Ag sobre los látex carboxilados S10C1 y S10C2 en función de la cantidad de proteína inicial a pH 5, 6 y 7. La densidad de proteína unida total (barras oscuras) es comparada con la unida luego de la etapa de desorción con Tritón X-100 (barras claras). Los porcentajes sobre las barras indican la fracción de proteína unida covalentemente y las barras de error indican la desviación estándar para $n = 3$.

En todos los casos, la cantidad de proteína total unida aumentó con la concentración de proteína adicionada, y la relación entre ésta y la cantidad de proteína inicial (f_T) disminuyó al aumentar C°_{P35Ag} . Por ejemplo, para el látex S8C1 a pH 6, estas relaciones fueron 0,90 para $C^{\circ}_{P35Ag} = 0,3$ mg/mL, 0,75 para $C^{\circ}_{P35Ag} = 0,6$ mg/mL, y 0,68 para $C^{\circ}_{P35Ag} = 0,9$ mg/mL. También se observó el mismo comportamiento con la

relación entre la cantidad de proteína unida luego de la etapa de desorción y la cantidad de proteína inicial (f_c). Como se muestra en la Fig. 4.8, se obtuvieron resultados similares para los 4 látex analizados, indicando que la superficie de las partículas se va saturando por la proteína P35Ag.

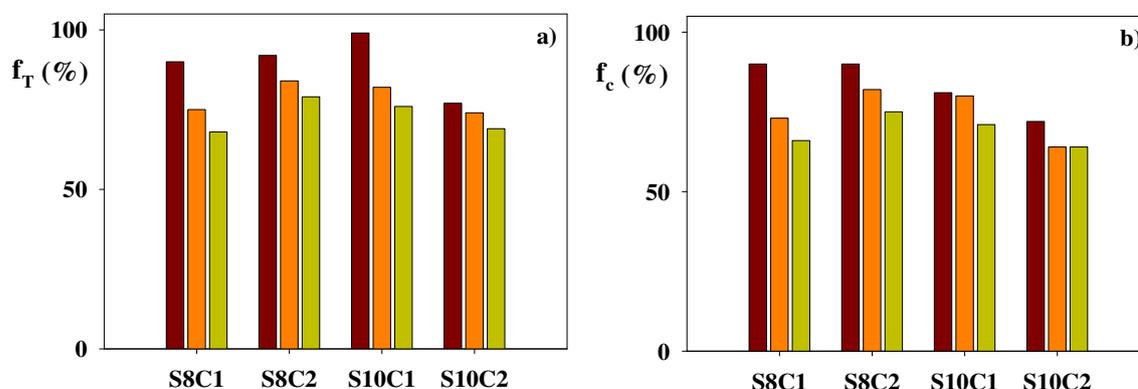


Figura 4.8. Porcentajes de P35Ag unida total (a) y P35Ag unida luego de la etapa de desorción con Tritón X-100 (b) respecto a la cantidad de proteína inicial, para los látex carboxilados S8C1, S8C2, S10C1 y S10C2. Resultados de las sensibilizaciones realizadas a pH 6. $C^{\circ}_{P35Ag} = 0,3$ mg/mL (barras marrones), $C^{\circ}_{P35Ag} = 0,6$ mg/mL (barras anaranjadas) y $C^{\circ}_{P35Ag} = 0,9$ mg/mL (barras verdes).

En general, para una determinada C°_{P35Ag} la mayor cantidad de proteína unida se obtuvo a pH 6, cerca del pI de P35Ag (pI experimental = 6,33). Por ejemplo, para el látex S8C2, $\Gamma_{P35Ag, cov} = 4,4$ mg/m² para $C^{\circ}_{P35Ag} = 0,9$ mg/mL (Fig. 4.6). A este pH, la repulsión entre la superficie de la partícula y la proteína es mínima, al igual que la repulsión entre las moléculas vecinas de proteína (repulsiones intermoleculares) y dentro de la misma biomolécula (repulsiones intramoleculares). Cuando hay repulsión intramolecular, las moléculas proteicas se distienden y cambian de conformación; por lo tanto ocupan una mayor superficie por molécula de proteína y la cantidad de proteína unida es menor. A pH 5 la superficie del látex tiene una carga neta negativa, mientras que la proteína recombinante tiene una carga neta positiva. En estas condiciones, la convergencia de las proteínas hacia la superficie de la partícula se ve favorecida por interacciones electrostáticas atractivas. Sin embargo, hay un efecto de repulsión entre las moléculas de proteína adyacentes, debido a que tienen la misma carga eléctrica, y otro efecto debido a las repulsiones intramoleculares. A pH 7 la proteína está cargada negativamente, la repulsión entre las moléculas vecinas se mantiene, al igual que las

repulsiones intramoleculares, pero se añade la repulsión electrostática entre las moléculas de proteína y la superficie de la partícula, que también presenta carga negativa. En general, la menor cantidad de proteína unida se observó a pH 7. Continuando con el ejemplo anterior del látex de S8C2, para $C^{\circ}_{P35Ag} = 0,9 \text{ mg/mL}$, $\Gamma_{P35Ag, cov} = 3,6 \text{ mg/m}^2$ a pH 5 y $\Gamma_{P35Ag, cov} = 3,3 \text{ mg/m}^2$ a pH 7 (Fig. 4.6).

En cuanto al efecto de la densidad superficial de grupos funcionales sobre la cantidad de proteína unida, se observaron mayores valores de $\Gamma_{P35Ag, cov}$ en los casos de los látex S8C2 y S10C1, que corresponden a las partículas con mayor densidad de grupos carboxilos superficiales (Tabla 2.6) disponibles para reaccionar con los grupos amino de las proteínas.

Las altas fracciones de proteína unida luego de la etapa de desorción con Tritón X-100 hacen innecesaria esta operación final. Además, trabajando con proteínas antigénicas del *Trypanosoma cruzi*, Garcia y col. (2013) evaluaron la influencia del tipo de emulsificante sobre el proceso de desorción, empleando el emulsionante aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS) en lugar del no iónico Tritón X-100. En dicho trabajo, se obtuvieron similares resultados con ambos emulsificantes.

Los experimentos de acoplamiento covalente del antígeno P22Ag sobre la superficie de los látex carboxilados se realizaron a pH 6 y a C°_{P22Ag} crecientes (0,3-0,9 mg/mL). Los resultados se muestran en las Figs. 4.9 y 4.10. Se alcanzaron mayores valores de proteína acoplada cuando se sensibilizaron los látex de menor tamaño S10C1 y S10C2. Cuando $C^{\circ}_{P22Ag} = 0,9 \text{ mg/mL}$ los valores de Γ observados fueron $\Gamma_{P22Ag, cov} = 4,26 \text{ mg/m}^2$ (S10C1) y $\Gamma_{P22Ag, cov} = 4,09 \text{ mg/m}^2$ (S10C2). En el caso de los látex de mayor tamaño S8C1 y S8C2, se observó un aumento inicial en la cantidad de P22Ag unida respecto a la cantidad de proteína añadida hasta alcanzar un *plateau*. Sin embargo, en el caso de los látex de menor tamaño S10C1 y S10C2 los valores de Γ aumentan a medida que aumenta C° sin llegar al *plateau* observado anteriormente. Una posible explicación a este comportamiento es que las proteínas podrían distribuirse mejor sobre las partículas de menor tamaño (menor impedimento estérico). A su vez, este efecto fue más pronunciado en P22Ag que en P35Ag, posiblemente debido a su mayor PM (35,2 kDa). Sin embargo, este comportamiento no se observó en los experimentos de AF, probablemente debido a la menor cantidad de proteína adsorbida en aquel caso (Fig. 4.2). Finalmente, en el látex de mayor tamaño S13C1, la cantidad de

P22Ag acoplada también fue menor para la misma cantidad de C°_{P22Ag} , lo cual refuerza la hipótesis del aumento del impedimento estérico cuando aumenta el tamaño de partícula.

Al igual que en las sensibilizaciones con P35Ag, se observó una saturación de la superficie de las partículas con P22Ag y un elevado porcentaje de proteína que permanece unida luego de la desorción con Tritón X-100 (Fig. 4.11).

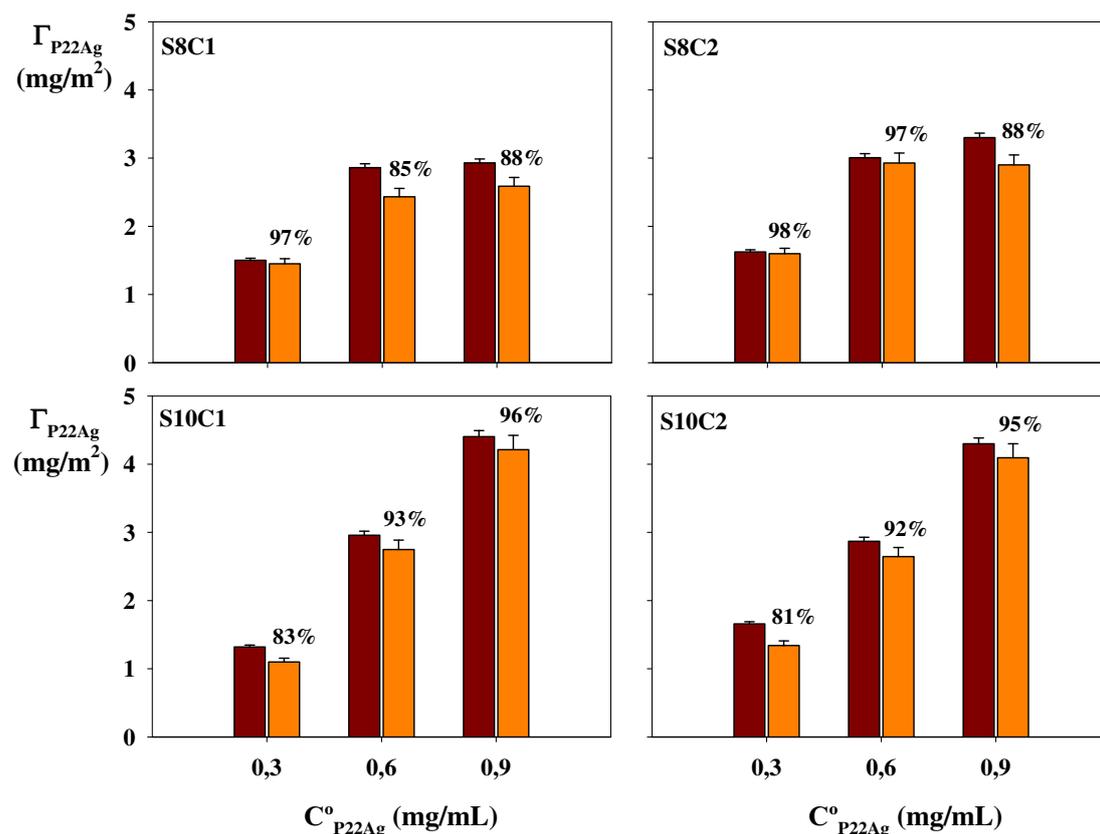


Figura 4.9. Acoplamiento químico de P22Ag sobre los látex carboxilados S8C1, S8C2, S10C1 y S10C2 en función de la cantidad de proteína inicial a pH 6. La densidad de proteína unida total (barras oscuras) es comparada con la unida luego de la etapa de desorción con Tritón X-100 (barras claras). Los porcentajes sobre las barras indican la fracción de proteína unida covalentemente y las barras de error indican la desviación estándar para $n = 3$.

Por las dificultades experimentales que conlleva la obtención del homogenato del *T. gondii*, sólo se realizaron sensibilizaciones a pH y concentración inicial de proteína fijos (pH 6, $C^{\circ}_{Hom} = 0,6$ mg/mL). Los resultados del acoplamiento covalente del homogenato del parásito sobre los látex carboxilados se muestran en la Fig. 4.12. La fracción de proteína unida luego de la etapa de desorción es relativamente baja

(comparada con las proteínas recombinantes). 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.

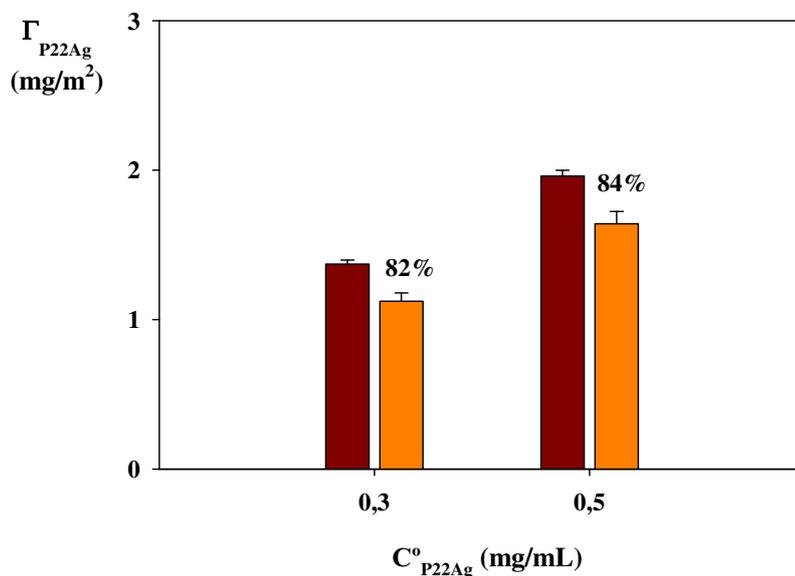


Figura 4.10. Acoplamiento químico de P22Ag sobre el látex carboxilado S13C1 en función de la cantidad de proteína inicial a pH 6. La densidad de proteína unida total (barras oscuras) es comparada con la unida luego de la etapa de desorción con Tritón X-100 (barras claras). Los porcentajes sobre las barras indican la fracción de proteína unida covalentemente y las barras de error indican la desviación estándar para $n = 3$.

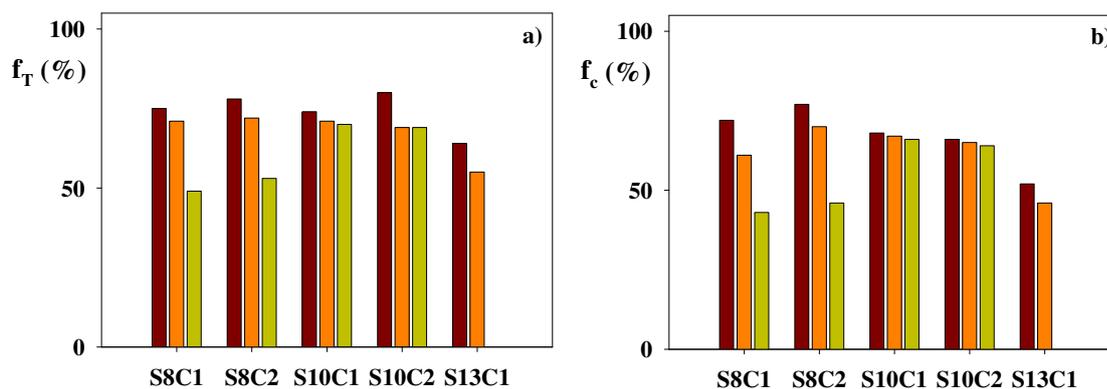


Figura 4.11. Porcentajes de P22Ag unida total (a) y P22Ag unida luego de la etapa de desorción con Tritón X-100 (b) respecto a la cantidad de proteína inicial, para los látex carboxilados S8C1, S8C2, S10C1, S10C2 y S13C1. $C^{\circ}_{P22Ag} = 0,3$ mg/mL (barras marrones), $C^{\circ}_{P22Ag} = 0,6$ mg/mL (barras anaranjadas) y $C^{\circ}_{P22Ag} = 0,9$ mg/mL (barras verdes).

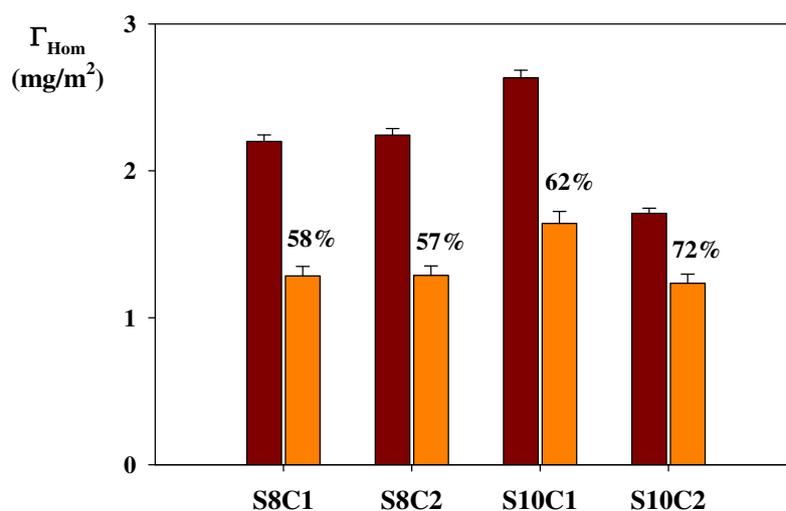


Figura 4.12. Acoplamiento químico del homogenato de *T. gondii* sobre los látex carboxilados S8C1, S8C2, S10C1 y S10C2 a pH 6 y concentración de proteína inicial de 0,6 mg/mL. La densidad de proteína unida total (barras oscuras) es comparada con la unida luego de la etapa de desorción con Tritón X-100 (barras claras). Los porcentajes sobre las barras indican la fracción de proteína unida covalentemente y las barras de error indican la desviación estándar para $n = 3$.

4.2.3. Unión Covalente de P22Ag sobre Partículas con Funcionalidad Epoxi

A efectos de evaluar las condiciones experimentales que optimicen el acoplamiento químico de las proteínas sobre las partículas con funcionalidad epoxi S8E1 y S8E2, se trabajó primero con albúmina sérica bovina (BSA) como proteína modelo. Para ello, se realizaron experimentos tipo “batch” a temperatura ambiente y se evaluó el efecto de la FI del medio y del tiempo de incubación sobre la cantidad de proteína unida por unidad de área superficial.

Los experimentos se llevaron a cabo mezclando en tubos eppendorf de 1,5 mL las partículas de látex con funcionalidad epoxi ($0,1 \text{ m}^2$ de superficie en cada caso) con buffer fosfato de pH 7 (FI final 2 mM y 12 mM) y una solución de BSA de 1 mg/mL. Con fines comparativos, se realizó el mismo procedimiento sobre el látex de PS S8. Para cada ensayo se preparó un blanco sin proteína. Según Dorman y Mani (1980) la reacción entre una proteína y los grupos epoxi ocurre a pH entre 7 y 9. Teniendo en

cuenta esto, se decidió trabajar a pH 7 que es el valor más cercano al pI de la BSA ($pI_{BSA} = 4,7$).

Las muestras se agitaron suavemente durante 1 y 6 días, y posteriormente se realizaron centrifugaciones a 10.000 rpm durante 30 min. La proteína presente en el sobrenadante se cuantificó por espectrofotometría, midiendo la A a 280 nm. La cantidad total de proteína unida a la superficie de las partículas se determinó por balance de masas como se describió en el apartado 4.2.2. A continuación, los CLP 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 debido a que la presencia de emulsificante interfiere en la cuantificación de la proteína mediante espectrofotometría, y los CLP se redispersaron en buffer borato pH 8 para su almacenamiento. Los principales resultados se muestran en la Fig. 4.13.

En las condiciones experimentales ensayadas, la etapa de desorción con Tritón X-100 no logró desplazar la totalidad de la proteína adsorbida físicamente, lo cual se evidenció en la permanencia de BSA unida al látex de PS S8 (Fig. 4.13), donde no existe posibilidad de uniones covalentes. En este caso, las posibles fuerzas intervinientes en la adsorción son las interacciones hidrofóbicas, de Van der Waals y/o puentes hidrógeno. Por otro lado, luego de la etapa de desorción con emulsificante, la cantidad de proteína unida sobre los látex con funcionalidad epoxi fue mayor que la observada sobre el látex de PS. Estos resultados podrían explicarse por la presencia de las interacciones antes descritas como así también por la posible interacción covalente entre proteínas y superficie. Además, el acoplamiento fue favorecido por el tiempo de incubación y por la FI (Fig. 4.13d).

Por otra parte, para disminuir los tiempos de la sensibilización, se podría recurrir a un aumento en la temperatura de incubación, pero esto podría resultar en desnaturalizaciones de las biomoléculas que alteren su funcionalidad biológica. Por ejemplo, Shimizu y col. (2000), con el objetivo de proporcionar grupos amino (NH_2) a la superficie de látex epoxidados, realizaron la unión covalente de NH_4OH sobre las partículas durante 24 h a 70 °C. Esta temperatura de reacción es inviable en el caso de biomoléculas cuando se pretende que las mismas mantengan su conformación estructural y su funcionalidad. Respecto a la FI, aunque su efecto no fue muy significativo, se observó mayor cantidad de proteína unida a mayor FI. Este

comportamiento coincide con lo reportado por Mateo y col. (2002), y podría explicarse analizando el mecanismo de reacción entre las proteínas y los grupos epoxi. La unión covalente ocurre en 2 pasos: el primero de ellos consiste en la AF de las proteínas a la superficie de las partículas; y el segundo paso involucra la formación de los enlaces covalentes entre la biomolécula y el grupo funcional (Fig. 1.14). Según Mateo y col. (2002), a mayor FI se estarían favoreciendo las interacciones hidrofóbicas involucradas en el primer paso de este mecanismo.

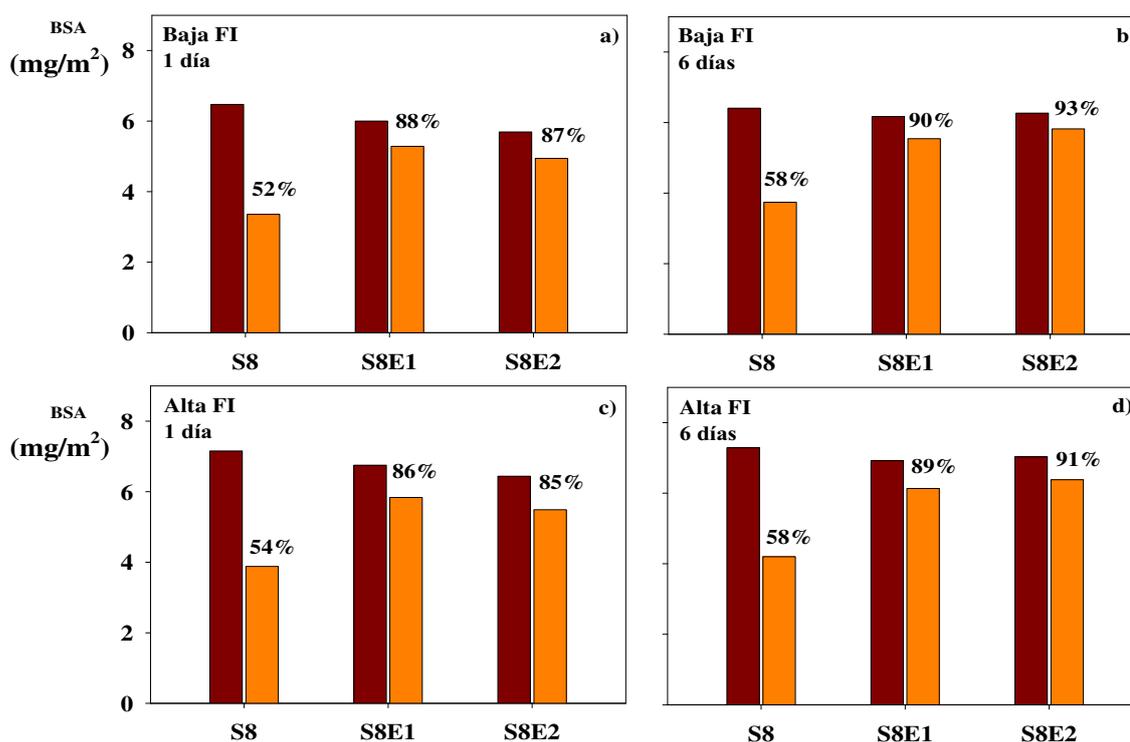


Figura 4.13. Acoplamiento de BSA sobre los látex S8, S8E1 y S8E2 a pH 7 y concentración de proteína inicial de 1 mg/mL a baja (a, b) y alta (c, d) FI del medio. Efecto del tiempo de incubación: 1 día (a, c) y 6 días (b, d). Las barras oscuras indican la proteína unida total y las barras claras indican la proteína unida luego de la desorción con Tritón X-100 por 24 h. Los porcentajes en las barras indican la relación entre la proteína remanente luego de la desorción respecto a la proteína unida total.

Posteriormente, se realizaron los experimentos de sensibilización de las partículas epoxidadas S8E1 y S8E2 con el Ag recombinante P22Ag. Para ello, se mezclaron en tubos eppendorf de 1,5 mL las partículas de látex S8E1 y S8E2 (superficie 0,2 m²) con buffer fosfato pH 7 (FI final 12 mM) y C^o_{P22Ag} creciente (0,3-0,5 mg/mL). Las muestras

se agitaron suavemente durante 6 días y luego de este tiempo se procedió como se describió para el caso de la unión de BSA. Para cada ensayo se preparó un blanco sin proteína. Los resultados obtenidos se presentan en la Fig. 4.14.

Se observa que la unión de P22Ag fue similar en ambos látex, por lo que la diferencia en la densidad de grupos epoxi entre ambos no fue suficiente para influir en el proceso de acoplamiento. Además, para similar C°_{P22Ag} , la cantidad de proteína unida a los látex epoxidados fue menor que la unida a los látex con grupos carboxilo superficiales (Fig. 4.9), lo que podría deberse a la menor densidad de grupos funcionales de los látex S8E1 y S8E2 respecto de los carboxilados (Tablas 2.5 y 2.6).

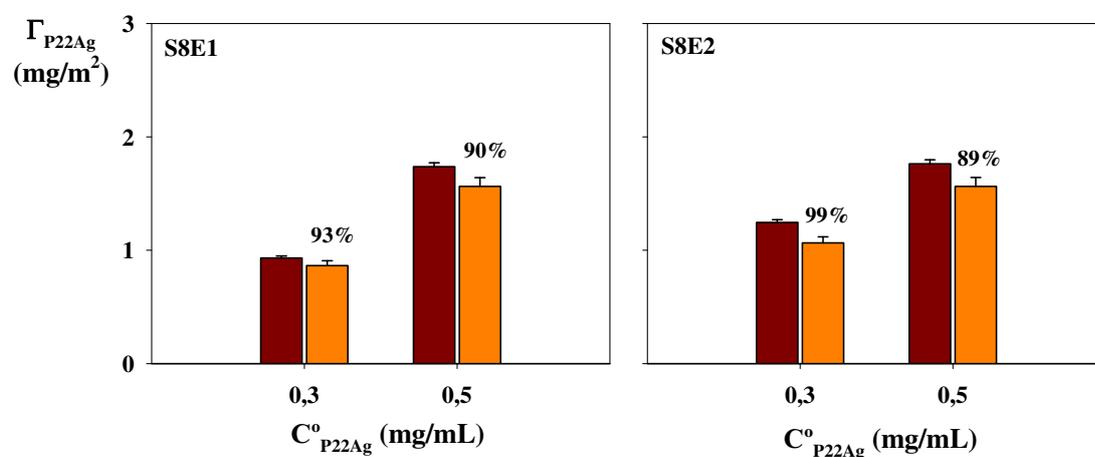


Figura 4.14. Acoplamiento de P22Ag sobre los látex S8E1 y S8E2 a pH 7 y concentración creciente de proteína inicial (0,3-0,5 mg/mL). Las barras oscuras indican la proteína unida total y las barras claras indican la proteína unida luego de la desorción con Tritón X-100 por 24 h. Los porcentajes en las barras indican la relación entre la proteína remanente luego de la desorción respecto a la proteína unida total.

4.2.4. Caracterización de los Complejos Látex-Proteína

Los CLP fueron caracterizados midiendo los diámetros medios por DLS (D_{DLS}) a 90° y por MDLS entre 50° y 120°. La estabilidad coloidal se analizó mediante la determinación de la c.c.c., medida por el método visual y por DLS, y a través de mediciones de μ_e y ζ . En las Tablas 4.1 a 4.5 se presentan las principales características de los CLP.

Tabla 4.1 Principales características de los complejos látex-proteína obtenidos por adsorción física sobre los látex de PS S8 y S10.

Látex	P35Ag		P22Ag		Homogenato	
	S10	S8	S10	S8	S10	S8
Γ (mg/m ²)	3,4	3,3	3,0	2,9	2,2	2,3
D_{DLS} a 90° (nm)	218	330	322	463	388	460
$-\mu_e \times 10^8$ (m ² /V.s)*	2,7	3,3	2,6	3,1	2,3	3,2
$-\zeta$ (mV)*	37,6	46,2	36,5	42	29,2	43,5
c.c.c. _{vis} (mM KBr)*	300	600	400	500	400	500
c.c.c. _{DLS} (mM KBr)*	100	200	100	200	200	400

* Determinado a pH 8

Tabla 4.2 Principales características de los complejos látex-proteína (CLP) obtenidos por unión covalente de P35Ag sobre 4 látex carboxilados a pH 6 y C° en aumento. Resultados de los CLP obtenidos luego de la desorción con Tritón X-100.

	S8C1-P35Ag			S8C2-P35Ag			S10C1-P35Ag			S10C2-P35Ag		
Γ_{P35Ag} (mg/m ²)	1,9	3,0	4,1	1,9	3,4	4,4	1,7	3,4	4,5	1,2	2,7	3,7
% UC	100	97	97	99	98	93	82	98	95	87	93	94
D_{DLS} a 90° (nm)	370	413	420	410	425	454	257	349	367	223	286	310
$-\mu_e \times 10^8$ (m ² /V.s)*	2,8	2,4	2,3	2,64	2,4	2,08	2,52	1,96	1,87	2,5	2,1	1,6
$-\zeta$ (mV)*	39,1	33,4	31,9	37,2	33,8	29,3	35,5	27,6	26,3	34,7	30,1	25,1
c.c.c. _{vis} (mM KBr)*	600	600	400	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	400	200	200
c.c.c. _{DLS} (mM KBr)*	200	200	100	>1000	900	700	>1000	>1000	>1000	100	0	0

* Determinado a pH 8

Tabla 4.3 Principales características de los complejos látex-proteína (CLP) obtenidos por unión covalente de P22Ag sobre 5 látex carboxilados a pH 6 y C° en aumento. Resultados de los CLP obtenidos luego de la desorción con Tritón X-100.

	S8C1-P22Ag			S8C2-P22Ag			S10C1-P22Ag			S10C2-P22Ag			S13C1-P22Ag	
Γ_{P22Ag}	1,5	2,4	2,6	1,6	2,9	2,9	1,1	2,7	4,2	1,3	2,6	4,1	1,1	1,6
% UC	97	85	88	98	97	88	83	93	96	81	92	95	82	84
D_{DLS} a 90°	538	534	606	401	421	485	280	329	425	199	311	322	1185	1226
$-\mu_e \times 10^8$ *	4,0	3,7	3,5	3,7	3,2	3,3	4,1	3,3	2,6	4,2	3,7	2,9	2,3	2,1
$-\zeta$ *	50,1	48,5	45	46,5	43	42,7	50,8	46	32,8	53,8	48,2	36,8	30,0	28,3
c.c.c. _{vis} *	300	300	300	>1000	1000	1000	1000	800	800	500	200	500	300	300
c.c.c. _{DLS} *	100	200	200	>1000	800	700	600	600	400	400	100	400	100	100

Unidades: Γ_{P22Ag} (mg/m²), D_{DLS} (nm), $-\mu_e \times 10^8$ (m²/V.s), $-\zeta$ (mV), c.c.c. (mM KBr.)* Determinado a pH 8

Tabla 4.4. Principales características de los complejos látex-proteína (CLP) obtenidos por unión covalente de P22Ag sobre los látex epoxidados a pH 7 y C° en aumento. Resultados de los CLP obtenidos luego de la desorción con Tritón X-100.

	S8E1-P22Ag		S8E2-P22Ag	
Γ_{P22Ag} (mg/m ²)	0,7	1,6	1,1	1,6
% UC	93	90	86	89
D_{DLS} a 90° (nm)	486	517	539	567
$-\mu_e \times 10^8$ (m ² /V.s)*	2,7	2,5	2,6	2,4
$-\zeta$ (mV)*	34,6	31,8	33,4	31,3
c.c.c. _{vis} (mM KBr)*	300	400	400	500
c.c.c. _{DLS} (mM KBr)*	200	300	300	400

* Determinado a pH 8

Tabla 4.5. Principales características de los complejos látex-proteína (CLP) obtenidos por unión covalente del homogenato de *T gondii* sobre 4 látex carboxilados a pH 6 y $C^0 = 0,6 \text{ mg/m}^2$. Resultados de los CLP obtenidos luego de la desorción con Tritón X-100.

	S8C1-Hom	S8C2-Hom	S10C1-Hom	S10C2-Hom
$\Gamma_{\text{Homogenato}} \text{ (mg/m}^2\text{)}$	1,3	1,3	1,6	1,2
% UC	58	57	62	72
$D_{\text{DLS a } 90^\circ} \text{ (nm)}$	456	442	412	291
$-\mu_e \times 10^8 \text{ (m}^2/\text{V.s)}^*$	2,6	2,4	2,4	2,6
$-\zeta \text{ (mV)}^*$	36	32,7	32	35,5
c.c.c. _{vis} (mM KBr)*	700	>1000	>1000	500
c.c.c. _{DLS} (mM KBr)*	500	>1000	>1000	300

* Determinado a pH 8

4.2.4.1. Análisis de los Complejos Látex-Proteína mediante DLS

Las mediciones de DLS a simple ángulo se realizaron a 90° y a una temperatura de 30°C . En todos los casos, los diámetros medios de los CLP fueron mayores que el diámetro del látex correspondiente y en general aumentaron con la cantidad de proteína unida. Este incremento en D_{DLS} se debe no sólo a la unión de proteína a la superficie de las partículas, sino también a cierto aumento en la polidispersidad del sistema en relación a los látex sin sensibilizar.

Las mediciones del diámetro medio de los complejos por MDLS se llevaron a cabo a 30°C , y a los siguientes ángulos de detección: 50° , 60° , 70° , 80° , 90° , 100° , 110° y 120° . 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 (Gugliotta y col., 2010). En la Fig. 4.15 se representan los diámetros promedio a cada ángulo de detección del látex S8C2 y de los 3 CLP S8C2-P35Ag a pH 6 para diferentes cantidades de proteína unida.

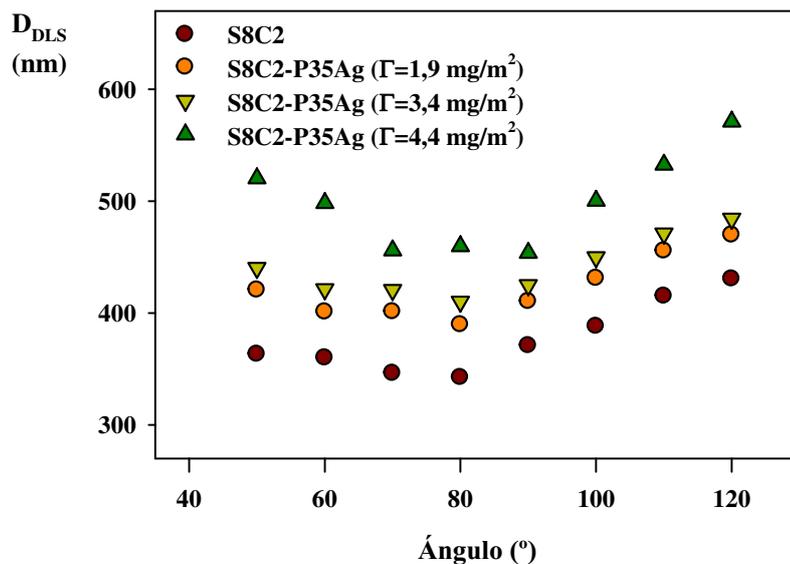


Figura 4.15. Diámetros medios medidos por MDLS (50°-120°) para el látex S8C2 y los 3 CLP obtenidos con diferente cantidad de P35Ag a pH 6.

Se observó cierta correspondencia entre la variación del D_{DLS} del látex sin sensibilizar y los CLP, lo que indicaría la ausencia de importantes aglomeraciones de partículas durante la sensibilización. Sin embargo, también se observó que cuanto mayor fue la cantidad de proteína unida, mayor fue el cambio en el diámetro a los diferentes ángulos, y más ancha la distribución de tamaños de partícula (PSD, del inglés “Particle Size Distribution”). En la Fig. 4.16 se muestran las distribuciones, basadas en la intensidad de luz dispersada (PLID, del inglés “Particle Light Intensity Distribution”), obtenidas por DLS a 90° para el látex S8C2 y los 3 CLP S8C2-P35Ag, con cantidades variables de proteína unida. Se determinó que existe un ensanchamiento en la PLID a medida que aumentó la cantidad de proteína unida, posiblemente debido a que la distribución de las biomoléculas no fue homogénea en todas las partículas. Aún cuando no se lo muestra, este comportamiento fue observado para todos los CLP estudiados.

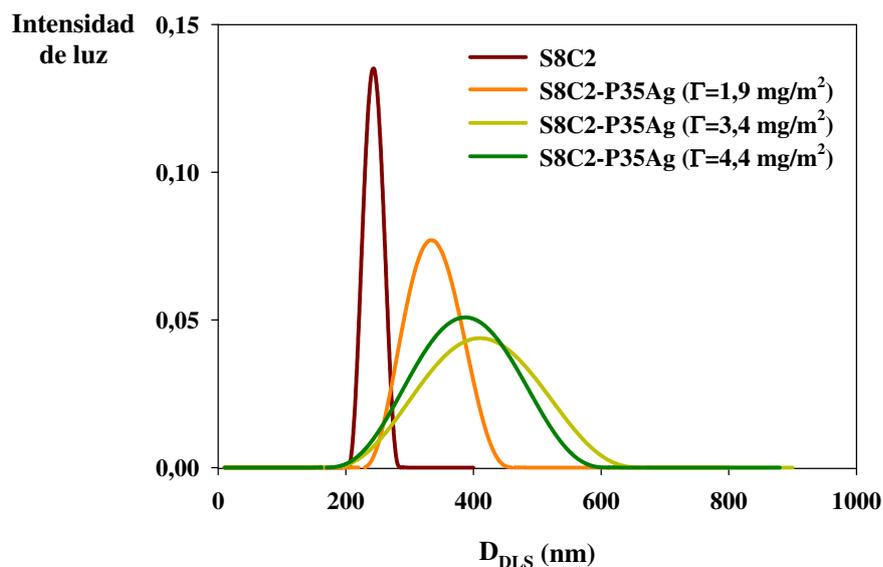


Figura 4.16. Comparación de las PLIDs del látex S8C2 y de 3 CLP con cantidades crecientes de P35Ag acoplada.

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

Se utilizó el procedimiento descrito previamente en el Capítulo 2, apartado 2.2.3.5a, para la determinación de la c.c.c. de los CLP a pH 8, utilizando tanto el método visual como DLS a 90°. Como en el Capítulo 2, la c.c.c. determinada por DLS a 90° fue la concentración de KBr a la cual el diámetro de partícula resultó un 10 % mayor al obtenido en medio acuoso (a FI cero). En la Fig. 4.17 se representa el diámetro de partícula obtenido por DLS a 90° frente a la concentración de KBr para el complejo S8C1-P35Ag ($\Gamma_{P35Ag} = 3,43 \text{ mg/m}^2$).

En los CLP obtenidos por la AF de los diferentes Ag sobre los látex de PS S8 y S10 (Tabla 4.1) y en los CLP obtenidos por la UC de P22Ag sobre los látex epoxidados S8E1 y S8E2 (Tabla 4.4), se observó que los valores de c.c.c. aumentaron respecto a los obtenidos para los látex sin sensibilizar (Tablas 2.5 y 2.7). A pH 8, las proteínas se encuentran con carga neta negativa, por lo tanto los CLP están más cargados que los látex de PS y los epoxidados, lo que posiblemente explique el aumento en los valores de c.c.c. observados. De manera similar, Ortega-Vinuesa y Bastos-González (2000)

reportaron un caso donde se determinó la c.c.c. a distintos pHs para CLP obtenidos por adsorción de BSA sobre partículas con funcionalidad sulfonato. A pH 4.8, correspondiente al punto isoelectrico de la BSA, la c.c.c. disminuyó al aumentar la cantidad de BSA adsorbida. Sin embargo, a pH 7, donde la proteína se encuentra cargada negativamente, la c.c.c. aumentó al aumentar la cantidad de BSA adsorbida sobre la superficie de las partículas, debido al aporte de las cargas de la proteína a este pH. Por otro lado, en los CLP aquí obtenidos a partir de los látex carboxilados (Tabla 2.6), los valores de c.c.c. en general fueron menores que en los látex sin sensibilizar. En estos casos, la carga eléctrica de los complejos podría ser menor luego del acoplamiento de las proteínas debido a que los grupos carboxilos, que eran los principales responsables de la carga eléctrica de los látex, disminuyeron al reaccionar covalentemente con las proteínas.

Además, la estabilidad coloidal de los CLP fue fuertemente afectada por las características previas de los látex sin sensibilizar. Por ejemplo, los CLP obtenidos de los látex carboxilados S8C2 y S10C1 (que presentaron mayor δ_{COOH} y h) a partir de los 3 Ag estudiados, mostraron los mayores valores de c.c.c. (Tablas 4.2 y 4.3).

En general, los resultados de c.c.c. indican que los complejos se mantendrían estables en las condiciones en que tendrá lugar el ensayo de IA.

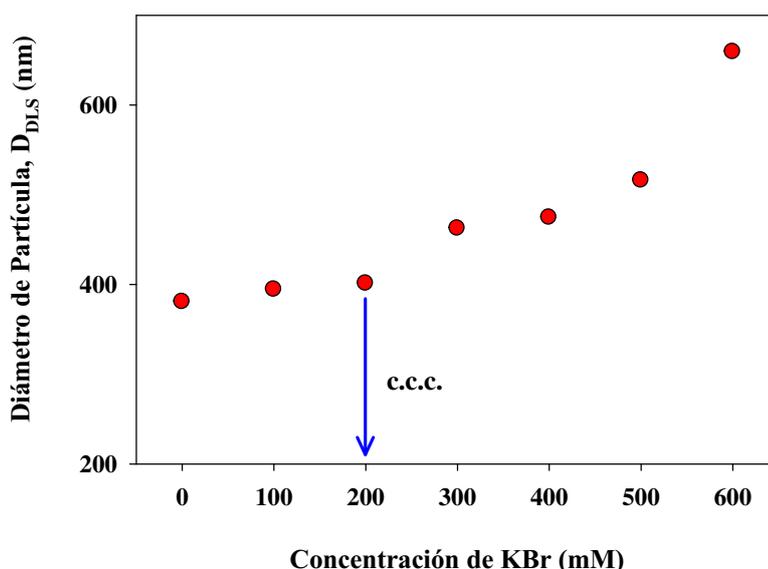


Figura 4.17. Determinación de la c.c.c. por DLS a 90° y a pH 8. Diámetro medio de partícula del complejo S8C1-P35Ag ($\Gamma = 3,43 \text{ mg/m}^2$) frente al agregado de KBr.

4.2.4.3. Determinación de la Movilidad Electroforética y del Potencial Zeta de los Complejos Látex-Proteína

En la Fig. 4.18 se muestran los resultados de μ_e para 4 de los látex carboxilados antes y después de ser sensibilizados con la proteína recombinante P35Ag. Se observa una caída drástica de la μ_e , y por lo tanto de la estabilidad electrocinética del sistema, por el acoplamiento de proteína a las partículas. También se observa que a mayor cantidad de proteína unida, menor fue μ_e , y este comportamiento se observó en todos los CLP obtenidos (Tablas 4.2-4.4). Estos resultados son consistentes con los reportados por Ortega-Vinuesa y col. (1996), donde se compararon las μ_e de látex carboxilados sin sensibilizar y sensibilizados con IgG mediante AF y UC. Estos autores señalaron que cuando una superficie lisa de polímero se cubre por macromoléculas, la misma se hace más estriada e irregular, alejando el plano de deslizamiento de la superficie y causando una disminución de μ_e y ζ .

4.2.5. Antigenicidad de las Proteínas Unidas a las Partículas Sintetizadas.

Se realizaron ensayos de ELISA con los distintos CLP obtenidos, con el propósito de evaluar la antigenicidad de las proteínas ancladas a la superficie de las partículas de látex; es decir analizar si P35Ag, P22Ag y el homogenato del *T. gondii* conservaron la capacidad de ser reconocidas por Ac específicos luego del proceso de acoplamiento a los látex.

El procedimiento llevado a cabo para los ensayos de ELISA consistió en sensibilizar microplacas de poliestireno con 500 ng / pocillo de proteína pura (P35Ag, P22Ag u homogenato del *T. gondii*) en buffer carbonato de pH 9,6; y aproximadamente 20 μ g / pocillo de cada uno de los CLP redispersados en buffer borato de pH 8. El protocolo continuó como se describió previamente en el Capítulo 3, apartado 3.2.5. En las Figs. 4.19 a 4.21 se presentan los resultados obtenidos cuando cada Ag purificado y 6 CLP se enfrentaron a los sueros controles. Las densidades ópticas (DO) obtenidas se indican como DO_{neg} , DO_{ag} y DO_{cr} cuando los sueros empleados fueron “negativo”,

“agudo” y “crónico”, respectivamente. Se determinaron también las relaciones entre las DO obtenidas para los diferentes sueros.

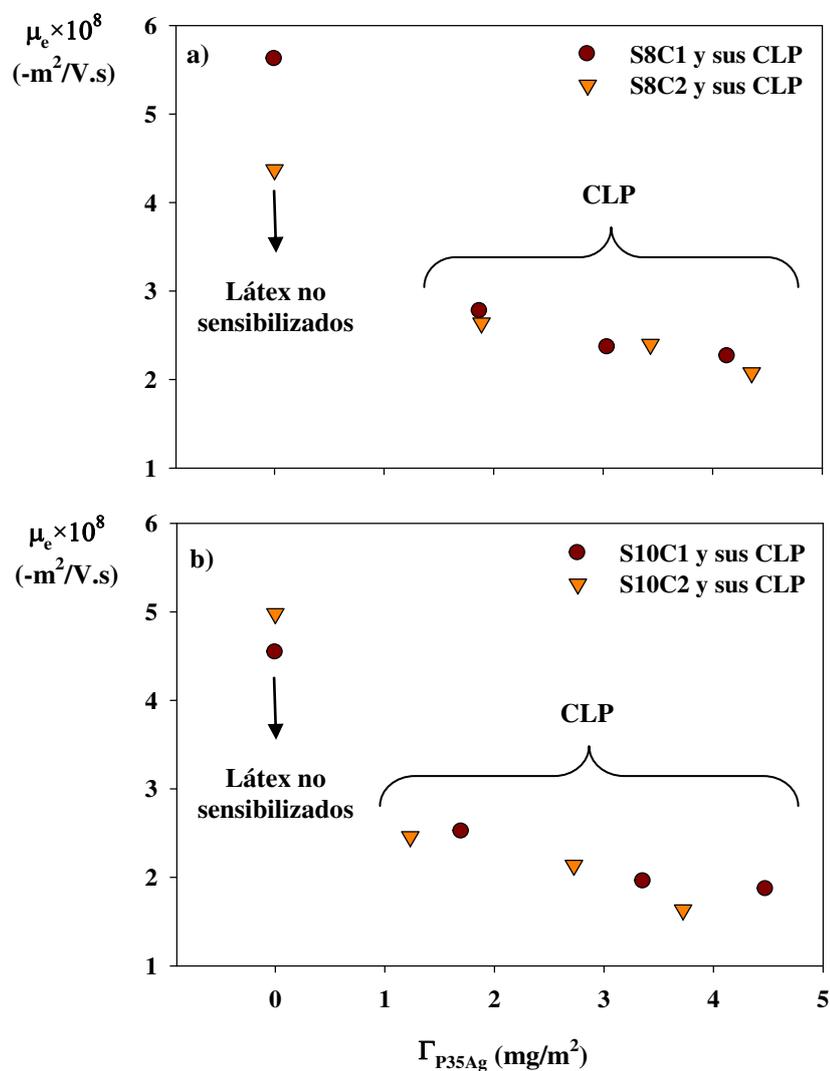


Figura 4.18. Movilidad electroforética de los látex carboxilados S8C1 y S8C2 (a); y S10C1 y S10C2 (b) junto a sus respectivos CLP obtenidos por unión covalente de P35Ag a pH 6 y a Γ_{P35Ag} creciente. La determinación de μ_e fue realizada a pH 8.

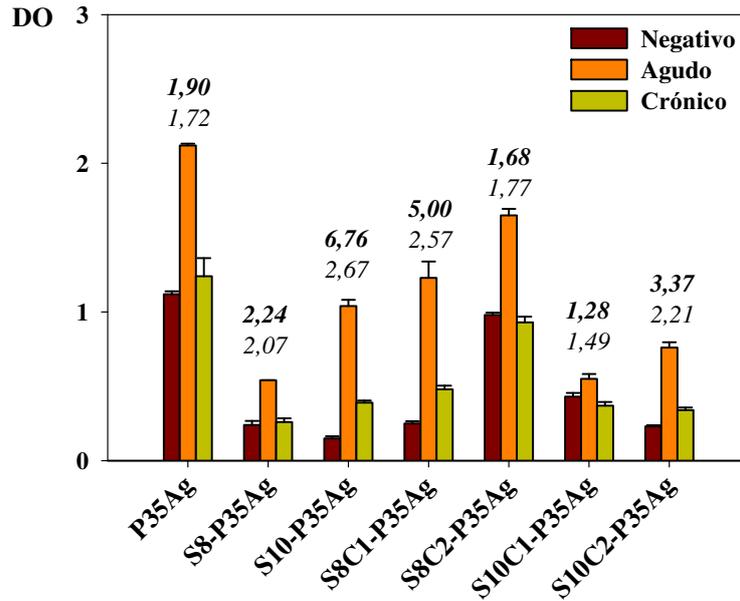


Figura 4.19. Resultados de ELISA obtenidos usando P35Ag y 6 CLP producidos por adsorción física y unión covalente (con similar $\Gamma_{P35Ag} = 3,0-3,7 \text{ mg/m}^2$). Los números sobre las barras indican la relación DO_{ag}/DO_{neg} (negrita) y la relación DO_{ag}/DO_{cr} (normal). Las barras de error representan el rango entre muestras duplicadas.

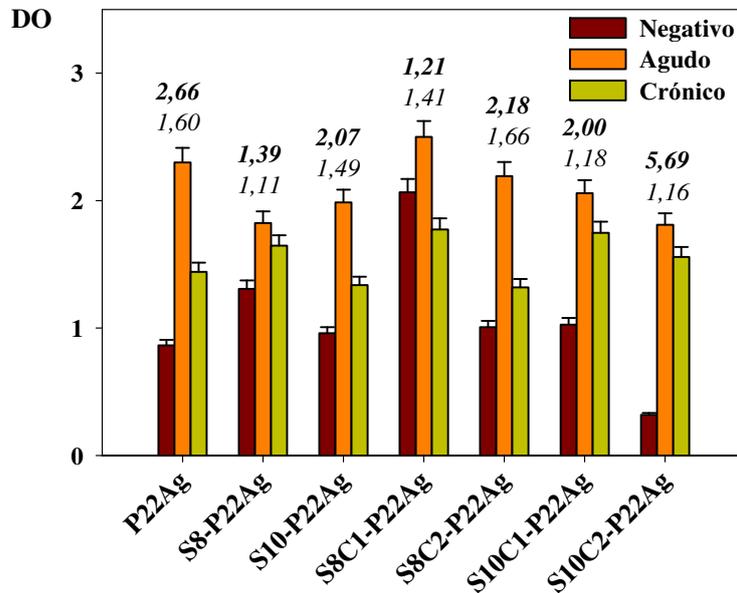


Figura 4.20. Resultados de ELISA obtenidos usando P22Ag y 6 CLP producidos por adsorción física y unión covalente (con similar $\Gamma_{P22Ag} = 2,4-3,0 \text{ mg/m}^2$). Los números sobre las barras indican la relación DO_{ag}/DO_{neg} (negrita) y la relación DO_{ag}/DO_{cr} (normal). Las barras de error representan el rango entre muestras duplicadas.

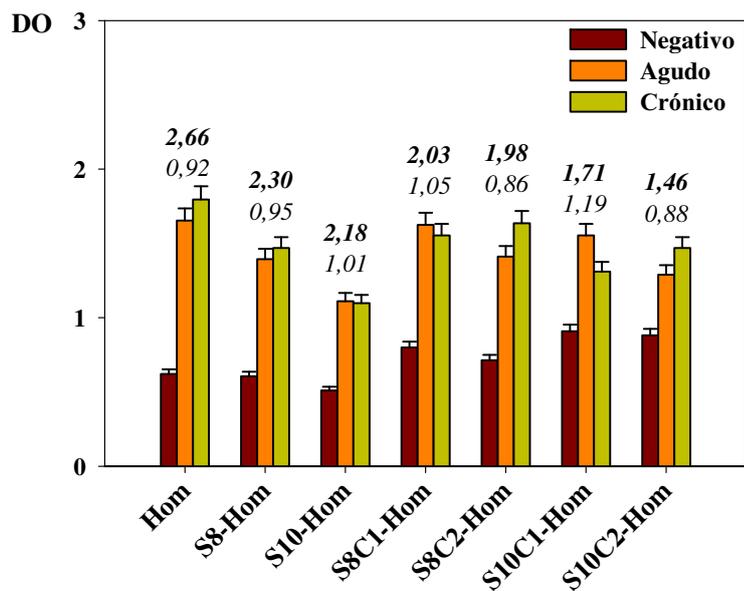


Figura 4.21. Resultados de ELISA obtenidos usando homogenato de *T. gondii* y 6 CLP producidos por adsorción física y unión covalente (con similar $\Gamma_{\text{Hom}} = 1,2-2,3 \text{ mg/m}^2$). Los números sobre las barras indican la relación $\text{DO}_{\text{ag}}/\text{DO}_{\text{neg}}$ (negrita) y la relación $\text{DO}_{\text{ag}}/\text{DO}_{\text{cr}}$ (normal). Las barras de error representan el rango entre muestras duplicadas.

Para las proteínas recombinantes de fase aguda, P35Ag y P22Ag, la DO_{ag} fue mayor que DO_{neg} y DO_{cr} en gran parte de los casos, lo que indica que los Ac generados en la primera etapa de la enfermedad fueron reconocidos de manera diferenciada. La mejor discriminación entre los sueros agudos, crónicos y negativos se observó con los complejos obtenidos a partir de P35Ag: S10-P35Ag ($\text{DO}_{\text{ag}}/\text{DO}_{\text{neg}} = 6,76$ y $\text{DO}_{\text{ag}}/\text{DO}_{\text{cr}} = 2,67$) y S8C1-P35Ag ($\text{DO}_{\text{ag}}/\text{DO}_{\text{neg}} = 5,00$ y $\text{DO}_{\text{ag}}/\text{DO}_{\text{cr}} = 2,57$). Con P22Ag, la discriminación del suero agudo fue menor que con P35Ag; en este caso los complejos que mejor discriminaron fueron S10-P22Ag ($\text{DO}_{\text{ag}}/\text{DO}_{\text{neg}} = 2,07$ y $\text{DO}_{\text{ag}}/\text{DO}_{\text{cr}} = 1,49$) y S8C2-P22Ag ($\text{DO}_{\text{ag}}/\text{DO}_{\text{neg}} = 2,18$ y $\text{DO}_{\text{ag}}/\text{DO}_{\text{cr}} = 1,66$).

Teniendo en cuenta que durante la sensibilización del látex, las proteínas pueden sufrir desnaturalización parcial u otros cambios no deseados que afecten sus características como reactivos de IA, los ensayos confirmaron que tanto P35Ag como P22Ag no se vieron afectadas durante este proceso, y en consecuencia los CLP producidos serían capaces de reconocer Ac específicos de fase aguda en los ensayos de IA.

Finalmente, en el caso de los complejos obtenidos a partir del homogenato del parásito, tampoco se observaron diferencias luego del acoplamiento a la superficie de las partículas; y como era de esperar, no permitieron discriminar de modo diferencial los sueros agudos respecto de los crónicos, aunque sí se observó que la DO_{neg} fue menor que las DO_{ag} y DO_{cr} en todos los casos.

4.3. CONCLUSIONES

Los antígenos obtenidos en el Capítulo 3 fueron empleados para sensibilizar los látex sintetizados y caracterizados en el Capítulo 2. Se estudiaron distintas variables y condiciones experimentales de 2 tipos de acoplamientos: adsorción física y unión covalente. Los CLP fueron caracterizados y se evaluó si las proteínas ancladas a la superficie de las partículas conservaron su antigenicidad.

Los ensayos de adsorción física permitieron determinar lo siguiente:

- Las fuerzas intervinientes en el proceso de AF de las proteínas recombinantes P35Ag y P22Ag sobre la superficie de las partículas de látex serían fundamentalmente de naturaleza hidrofóbica, ya que se observó que a medida que aumentó la hidrofobicidad de la superficie de las partículas, también aumentó la cantidad de proteína unida.
- Cuando se analizaron los resultados de AF de los diferentes antígenos (P35Ag, P22Ag y el homogenato del *T. gondii*) se observó una mayor cantidad de proteína unida por unidad de área superficial cuando se trabajó con las proteínas recombinantes; esto podría deberse a la composición indefinida del homogenato del parásito, que incluye una mezcla de proteínas con diferentes tamaños, puntos isoeléctricos, y afinidad por la superficie de los látex.
- No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de proteína adsorbida en función del tamaño de partícula, en el rango de diámetros analizado (130 – 300 nm).

Los ensayos de unión covalente sobre los látex carboxilados permitieron comprobar lo siguiente:

- El acoplamiento fue mayor cuando la sensibilización se realizó a un pH cercano al punto isoeléctrico de las proteínas, ya que en estas condiciones se minimizan las repulsiones inter- e intramoleculares, y también es mínima la repulsión entre la superficie de las partículas y las biomoléculas.

- Los látex carboxilados con mayores densidades de grupos funcionales permitieron un mayor acoplamiento covalente de proteínas. Por este motivo, los complejos originados a partir de los látex S8C2 y S10C1 presentaron mayores valores de Γ que los producidos con S8C1 y S10C2, respectivamente.

- En los ensayos realizados con las proteínas recombinantes se observó una elevada fracción de proteína unida (respecto a la unida total) luego del proceso de desorción con Tritón X-100, lo cual podría hacer innecesaria la etapa de desorción con emulsificante. En los ensayos realizados con el homogenato del *T. gondii*, la fracción de proteína unida fue menor (<70 %). Esto último podría 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.

En los experimentos de acoplamiento de P22Ag sobre los látex con funcionalidad epoxi se observó lo siguiente:

- Del estudio previo con la proteína modelo BSA se pudo concluir que las condiciones óptimas para realizar el acoplamiento químico sobre los grupos epoxi son de alta FI y 6 días de incubación.

- La diferencia en la densidad de grupos epoxi de los látex S8E1 y S8E2 no fue suficiente para influir en la cantidad de P22Ag unida.

- Para similar concentración de proteína inicial, C°_{P22Ag} , la cantidad de proteína unida a los látex epoxidados fue menor que la unida a los látex carboxilados, lo que podría deberse a la menor densidad de grupos funcionales de los látex S8E1 y S8E2 respecto de los carboxilados.

En la caracterización de los complejos látex-proteína se observó lo siguiente:

- Los CLP obtenidos a partir de los látex carboxilados S8C2 y S10C1 mostraron mayores valores de c.c.c. que los demás CLP. Esto se debe a que esos látex son los que presentaron las mayores densidades de carga y de grupos funcionales superficiales, que influyen en la estabilidad de los complejos frente al cambio de la fuerza iónica del medio.

- Para los CLP obtenidos a partir de los látex de PS y de los látex epoxidados, los valores de c.c.c. a pH 8 fueron ligeramente mayores en los CLP que en los látex sin sensibilizar, posiblemente debido a que a este pH las proteínas se encuentran con carga neta negativa, aportando un nuevo elemento a la estabilidad del sistema. En cambio, los látex carboxilados presentaron, en general, mayores valores de c.c.c. que sus CLP, probablemente debido a que los grupos carboxilo, que eran los responsables de la estabilidad de estos látex, disminuyeron al reaccionar con las biomoléculas.

- Durante el análisis por MDLS, se observó cierta correspondencia entre la variación del D_{DLS} del látex sin sensibilizar y de los CLP, lo que indicaría la ausencia de importantes aglomeraciones de partículas durante la sensibilización. Sin embargo, mediante el análisis de las PLIDs, se pudo determinar que existió un ensanchamiento en la PSD a medida que aumentó la cantidad de proteína unida, posiblemente debido a que la distribución de las biomoléculas no fue homogénea en todas las partículas.

Finalmente, se evaluó la antigenicidad de las proteínas acopladas a los látex y se observó que el proceso de sensibilización no alteró la funcionalidad biológica de las proteínas y que los CLP serían capaces de reconocer anticuerpos específicos en los ensayos de IA.

CAPÍTULO 5:

Aplicación de los Complejos Látex-Proteína en Ensayos de Inmunoaglutinación

5.1. INTRODUCCIÓN

En el campo del diagnóstico de enfermedades, la tendencia hacia el desarrollo de nuevos métodos con prestaciones mejoradas es permanente. Entre los principales objetivos que se persiguen se encuentra el hecho de contar con métodos diagnósticos más confiables, económicos y que no requieran mano de obra altamente calificada.

Desde el punto de vista clínico, la Toxoplasmosis es una enfermedad de difícil manejo, ya que la información que el profesional médico necesita para decidir su accionar no es fácil de obtener. En otro tipo de enfermedades, la presencia o ausencia de anticuerpos (Ac) específicos es suficiente para diagnosticar la patología; sin embargo, en el caso de la Toxoplasmosis, no se trata sólo de saber si el paciente tiene o no la infección, sino que lo fundamental es saber en qué momento se contrajo la enfermedad. Como se mencionó en los Capítulos anteriores, si una mujer contrae la enfermedad durante el período de gestación, las consecuencias sobre el feto pueden ser muy graves. Por otro lado, el tratamiento de la infección requiere de la administración de fármacos cuya toxicidad es inevitable y el balance riesgo/beneficio debe ser cuidadosamente evaluado. Por este motivo, el médico debe tener a disposición herramientas que le permitan diagnosticar con total seguridad si se trata o no de una infección por Toxoplasmosis aguda, antes de decidir iniciar el tratamiento.

Los principales métodos diagnósticos serológicos para Toxoplasmosis son: reacción de Sabin-Feldman (SF), inmunofluorescencia indirecta (IFI), enzimoimmunoensayo (ELISA, del inglés “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”), prueba de inmunoabsorción y aglutinación (ISAGA, del inglés “Immunosorbent Agglutination Assay”), prueba de avidéz de Ac, aglutinación directa (AD) y

hemaglutinación indirecta (HAI). Algunas de estas técnicas, como ELISA e IFI, presentan alta sensibilidad (S) y especificidad (E), pero tienen ciertas desventajas: i) el tiempo necesario para la realización de los ensayos; 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.

Para discriminar entre el estado agudo y el crónico de la Toxoplasmosis, es necesario aplicar varias de estas técnicas, aumentando tanto el costo económico como el de recursos humanos necesarios.

Dentro de las técnicas de aglutinación, la AD utiliza el parásito entero para amplificar la reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), mientras que en HAI se utilizan glóbulos rojos para la fijación de Ag. Otro método de detección disponible, es el ensayo de inmunoaglutinación (IA), 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 (Cambiaso y col., 1992; Quesada y col., 1996; Molina-Bolivar y col., 1998; Borque y col., 2000; Kawaguchi, 2000; Gibanel y col., 2001; Peula y col., 2002; Slomkowski y col., 2002; Gonzalez y col., 2008b, 2010; Garcia y col., 2013, 2014). Este método resulta rápido, es de sencilla realización e interpretación, y es especialmente útil en aquellos laboratorios con escaso personal y equipamiento. Sin embargo, los reactivos de IA actualmente disponibles no brindan información sobre el momento en que se produjo la infección. Una representación esquemática del proceso de IA se muestra en la Fig. 5.1.

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

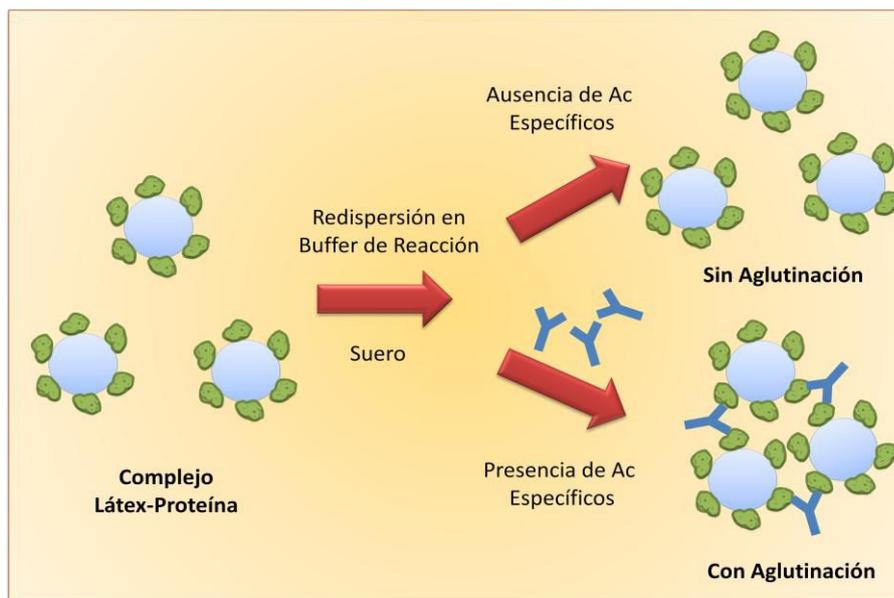


Figura 5.1. Esquema del proceso de inmunoaglutinación.

En esta Tesis, la reacción de IA se detectó por turbidimetría, es decir, midiendo los cambios de absorbancia (ΔA) en un espectrofotómetro convencional. Esta técnica permite la automatización del ensayo y elimina la subjetividad del operador.

El tipo de Ag, el tipo de unión a la superficie de las partículas, el medio de reacción del inmunoensayo y las características particulares de cada suero, tienen gran importancia en este tipo de ensayos. La discriminación entre los diferentes grupos evaluados, así como la S y la E de la técnica, son parámetros claves de los test diagnósticos que se ven influenciados por dichas variables.

El Ag empleado es decisivo para obtener buena E, ya que la afinidad de los Ac específicos hacia el Ag es lo que determina la utilidad o no del reactivo de IA. El empleo de Ag recombinantes en la sensibilización de las partículas mejora notablemente la E de la técnica. La S 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 cuanto a las características del suero, éste puede presentar interferentes para el biorreconocimiento, afectando tanto la E como la S del ensayo.

El propósito de este trabajo es desarrollar una herramienta de diagnóstico que sea útil en estudios de tamizajes, donde son analizadas gran cantidad de muestras. Luego, los sueros detectados como positivos por IA, deberían ser testeados con técnicas de referencia para confirmar o descartar el diagnóstico.

En ese marco, el objetivo final de esta Tesis es la obtención de partículas de látex sensibilizadas con Ag del *T. gondii*, que puedan actuar como reactivos de IA para detectar Toxoplasmosis y discriminar si la infección fue recientemente adquirida o se trata de una infección pasada. En primer lugar, se analizaron los distintos complejos látex-proteína (CLP) previamente obtenidos, que incluyen partículas de diferentes tamaños y con distintas densidades de grupos funcionales superficiales, para determinar cuáles presentan mejores niveles de discriminación entre sueros controles clasificados, por técnicas de referencia, como “negativos”, “agudos” y “crónicos”. Posteriormente, se analizó un panel de sueros y se evaluó la capacidad de los CLP seleccionados para detectar Ac de fase aguda contra el *T. gondii*. Se construyeron curvas ROC (del inglés “Receiver Operating Characteristic”) para determinar si existió buena discriminación de los sueros agudos, respecto de los crónicos y negativos. Se analizó el área bajo la curva (AUC, del inglés “Area Under the Curve”), y se evaluó la S y la E del ensayo para determinados valores de corte o “cut-off”.

5.2. TRABAJO EXPERIMENTAL

Los ensayos de IA se realizaron sobre la base de todos los CLP sintetizados en el Capítulo 4. En primer lugar, se trabajó con los CLP obtenidos a partir de los látex carboxilados S8C1 y S8C2 para estudiar las condiciones óptimas del ensayo de IA. Posteriormente, se evaluaron todos los CLP obtenidos frente a sueros controles y se seleccionaron algunos para enfrentarlos frente a un panel de sueros.

5.2.1. Estudio de la Influencia de las Condiciones de Reacción Utilizando Sueros Controles

El objetivo de este estudio fue determinar las condiciones de reacción que permiten una mayor discriminación entre las distintas muestras de suero. El ensayo de IA consistió en mezclar 950 µL de la suspensión del CLP a una concentración conocida,

con 50 μL de suero que puede contener Ac anti-*T. gondii* de fase aguda (suero agudo), Ac anti-*T. gondii* de fase crónica (suero crónico), o no poseerlos (suero negativo). La reacción de IA se detectó por turbidimetría, midiendo los ΔA después de 5 minutos de reacción a una longitud de onda de 570 nm, en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 25 UV/vis Spectrometer). El ΔA se determinó restando al correspondiente valor de absorbancia (A) medido, el valor de A de un blanco, que consistió en el CLP investigado sin la adición de suero. Las mediciones de A 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.

Se trabajó con sueros controles, previamente clasificados por técnicas de referencia en “negativos”, “agudos” y “crónicos”. Los sueros, cedidos por el Laboratorio Central de la Provincia de Santa Fe, fueron centrifugados durante 10 minutos a 10.000 rpm antes de su uso, a fin de eliminar interferencias propias del mismo.

5.2.1.a. Influencia del Tiempo de Reacción

El tiempo de reacción (t) se define como el transcurrido entre la mezcla del suero con el CLP y la lectura de la A. En primer lugar, y en base a la bibliografía existente, se decidió establecer un tiempo de reacción de 5 minutos, analizándose la evolución de A en función de t. Como queda reflejado en la Fig. 5.2, donde se utilizó el complejo S8C1-P35Ag con 3,04 mg/m^2 de proteína unida luego del proceso de desorción, la respuesta del suero agudo se diferencia claramente de la correspondiente a los sueros negativo y crónico desde el comienzo de la reacción ($t=0$). A continuación, se calculó el cociente entre el ΔA correspondiente al suero agudo y el ΔA para el suero negativo ($\Delta A_{\text{ag}}/\Delta A_{\text{neg}}$); y el cociente entre el ΔA correspondiente al suero agudo y el ΔA para el suero crónico ($\Delta A_{\text{ag}}/\Delta A_{\text{cr}}$). En la Fig. 5.3 se presenta la evolución de estos cocientes en función del tiempo de reacción.

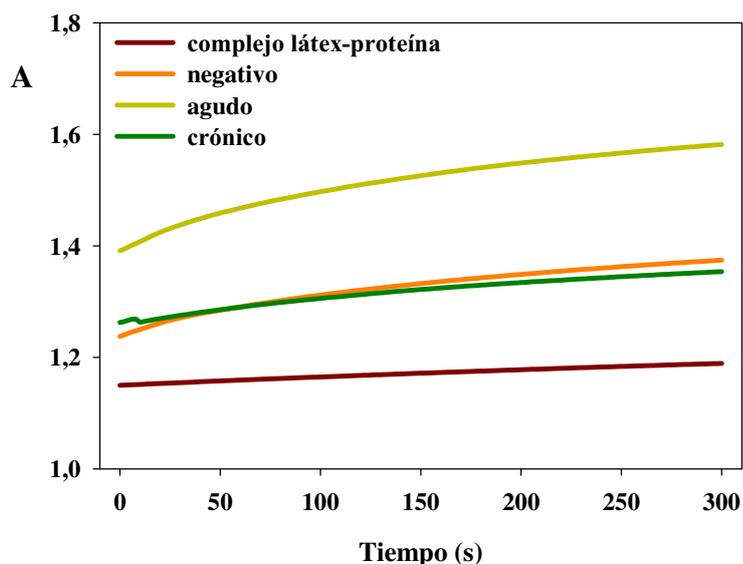


Figura 5.2. Influencia del tiempo de reacción durante el ensayo de IA utilizando sueros controles. Evolución de la absorbancia a 570 nm del complejo S8C1-P35Ag ($\Gamma_{P35Ag} = 3,04 \text{ mg/m}^2$) en ausencia del suero y después de mezclarlo con sueros negativo, agudo y crónico.

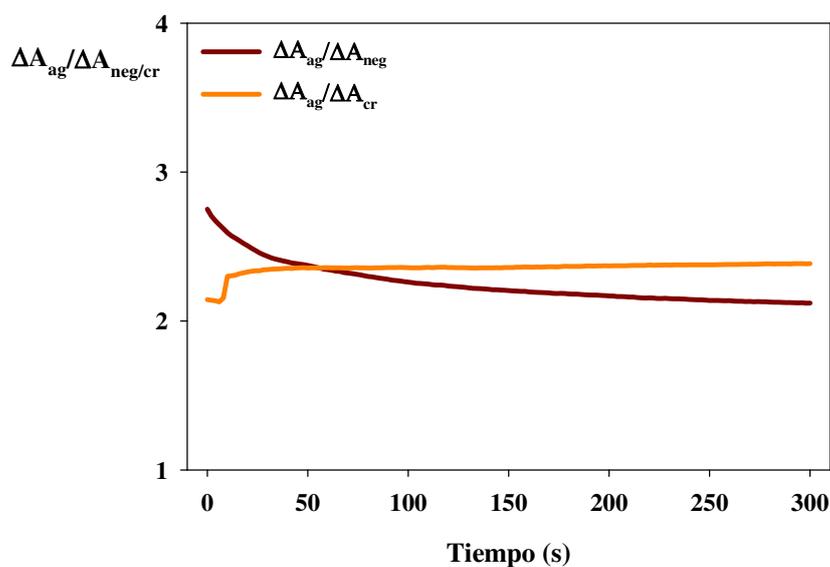


Figura 5.3. Evolución del cociente entre el ΔA correspondiente al suero agudo y el ΔA para el suero negativo ($\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$); y del cociente entre el ΔA correspondiente al suero agudo y el ΔA para el suero crónico ($\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$) en función del tiempo de reacción.

Se puede observar que $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$ disminuye en función del tiempo, indicando que el aumento de A registrado por el suero negativo es mayor que el aumento de A registrado por el suero agudo; es decir que, a medida que transcurre el tiempo, se

estarían produciendo aglutinaciones inespecíficas en presencia del suero negativo. Por tal motivo, la reacción de aglutinación no debería extenderse a más de 5 minutos (García, 2011). Por otro lado, el cociente $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$ aumenta en los primeros segundos de reacción y luego se estabiliza, indicando que la reacción de aglutinación podría evaluarse a un tiempo menor a los 5 minutos propuestos en la literatura. Sin embargo, para unificar criterios de comparación, en lo sucesivo los resultados de los inmunoensayos se realizarán tomando como tiempo de reacción 5 minutos.

5.2.1.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 el complejo S8C2-P35Ag con $3,43 \text{ mg/m}^2$ de proteína unida luego del proceso de desorción. Este complejo fue diluido en una solución salina de BSA pH 8, sobre la cual se realizaron distintos agregados hasta encontrar las condiciones óptimas del medio que permitan la mayor discriminación del suero agudo respecto del crónico y del negativo durante el inmunoensayo.

La solución salina de BSA contiene $0,5 \text{ mg/mL}$ 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 disminuir las reacciones inespecíficas; y la azida sódica es un agente antimicrobiano.

En las Figs. 5.4 a 5.6 se muestra el ΔA por la adición de sueros controles después de 5 minutos de reacción para el complejo S8C2-P35Ag ($\Gamma_{P35Ag} = 3,43 \text{ mg/m}^2$) en dos condiciones de fuerza iónica (FI): a) baja FI (20 mM) y b) alta FI (150 mM). Los resultados de la Fig. 5.5 muestran el efecto del agregado de glicina ($0,1 \text{ M}$) sobre el buffer de reacción, y los de la Fig. 5.6 muestran el efecto del agregado de glicina ($0,1 \text{ M}$) y polietilenglicol (PEG) 8000 al $3\% \text{ m/v}$ sobre el buffer de reacción.

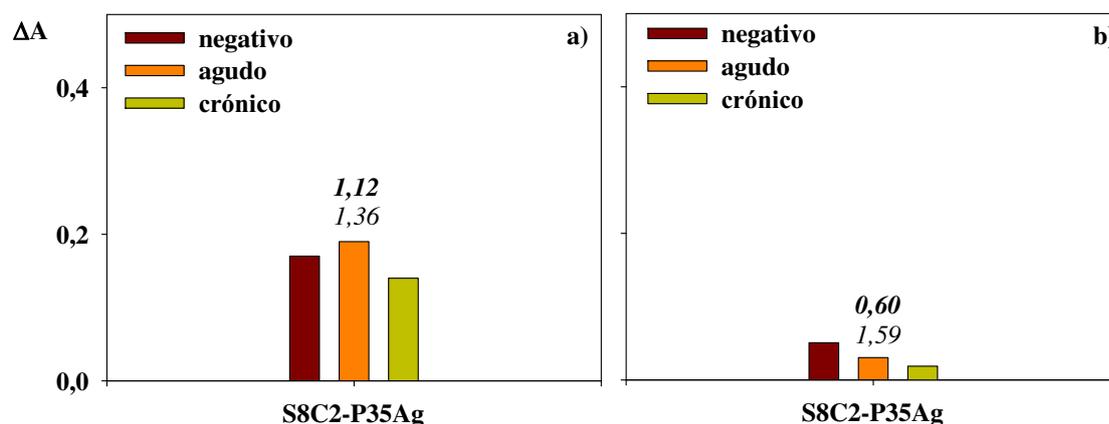


Figura 5.4. Variación de absorbancia por la adición de sueros controles negativo, agudo y crónico sobre el complejo S8C2-P35Ag ($\Gamma_{P35Ag} = 3,43 \text{ mg/m}^2$) después de 5 minutos de reacción a: a) baja fuerza iónica (20 mM); y b) alta fuerza iónica (150 mM). Los números sobre las barras indican las relaciones $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$ (negrita) y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$.

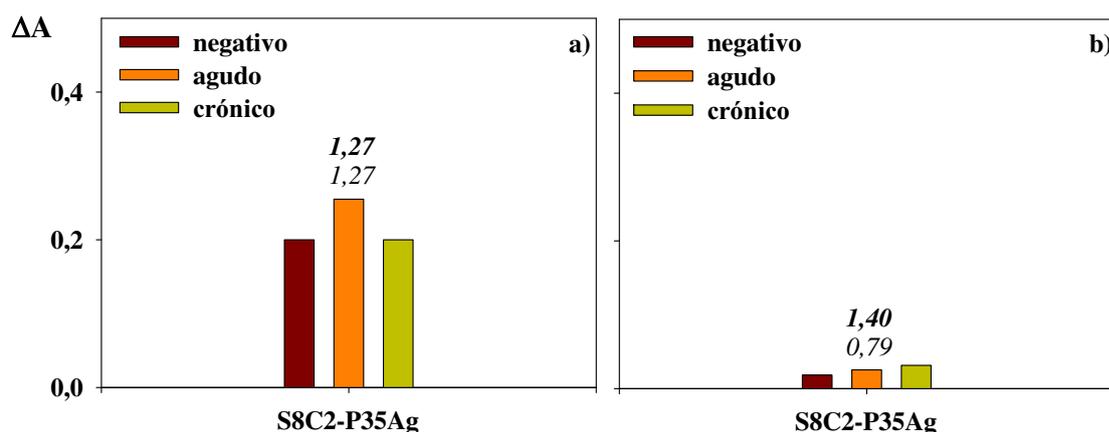


Figura 5.5. Variación de absorbancia por la adición de sueros controles negativo, agudo y crónico sobre el complejo S8C2-P35Ag ($\Gamma_{P35Ag} = 3,43 \text{ mg/m}^2$) después de 5 minutos de reacción a: a) baja fuerza iónica (20 mM) y en presencia de glicina (0,1 M); y b) alta fuerza iónica (150 mM) y en presencia de glicina (0,1 M). Los números sobre las barras indican las relaciones $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$ (negrita) y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$.

Del análisis de las condiciones del medio de reacción probadas, se pudo concluir que la presencia de glicina y de PEG 8000 al buffer de baja FI es la mejor opción a la hora de formular el medio de reacción para llevar a cabo los ensayos de IA, ya que permitió la mayor discriminación del suero agudo, respecto del crónico y del negativo.

Cuando la FI del medio es baja, las cadenas poliméricas que están unidas covalentemente al Ag están extendidas hacia la solución, y por lo tanto los Ag se encuentran más expuestos para interactuar con los Ac presentes en el suero. Por el contrario, a alta FI, las cadenas poliméricas se encontrarían más cercanas a la superficie de la partícula y esto podría obstruir el acceso de los Ac por impedimento estérico u oclusión (García y col., 2014).

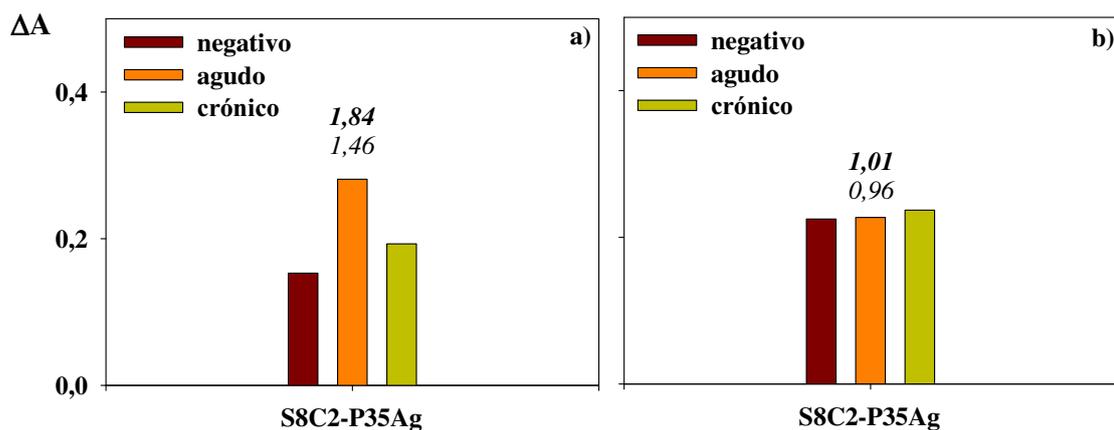


Figura 5.6. Variación de absorbancia por la adición de sueros controles negativo, agudo y crónico sobre el complejo S8C2-P35Ag ($\Gamma_{P35Ag} = 3,43 \text{ mg/m}^2$) después de 5 minutos de reacción a: a) baja fuerza iónica (20 mM) y en presencia de glicina (0,1 M) y PEG 8000 (3%); y b) alta fuerza iónica (150 mM) y en presencia de glicina (0,1 M) y PEG 8000 (3%). Los números sobre las barras indican las relaciones $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$ (negrita) y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$.

La glicina actúa como agente bloqueante de los grupos funcionales superficiales que quedaron libres de Ag. Además, según Miraballes-Martínez y col. (1997), el PEG aumenta la concentración efectiva de los reactivos en la solución. En este caso, el PEG promueve la aglutinación, ya que desplaza moléculas de agua en la interfase partícula-medio de reacción, permitiendo una mejor exposición de los epitopes del Ag y favoreciendo así la formación de la red de aglutinación formada por la presencia de los Ac específicos. Finalmente, en todos los CLP estudiados, la A del blanco (CLP en ausencia de suero) permaneció constante durante el tiempo del inmunoensayo, por lo que se pueden considerar coloidalmente estables en las condiciones estudiadas.

5.2.2. Comparación de Diferentes Complejos Látex-Proteína Utilizando Sueros Controles

Se estudiaron diferentes CLP en ensayos de IA bajo las siguientes condiciones de reacción: baja FI (20 mM), en presencia de glicina (0,1 M) y PEG 8000 (3 %). Los CLP analizados fueron seleccionados por poseer similar cantidad de proteína unida a su superficie y se resumen en la Tabla 5.1. En las Figs. 5.7 a 5.10 se muestran los ΔA para cada CLP luego de 5 minutos de la adición de los sueros controles negativo, agudo o crónico.

Tabla 5.1. Complejos látex-proteína evaluados en ensayos de inmunoaglutinación.

Complejo Látex-Proteína	Látex	Funcionalidad	Antígeno	Γ (mg/m ²)	Tipo de Unión
S8-Hom	S8	-	Homogenato	2,26	Adsorción Física
S8-P35Ag	S8	-	P35Ag	2,70	Adsorción Física
S8-P22Ag	S8	-	P22Ag	2,93	Adsorción Física
S10-Hom	S10	-	Homogenato	2,16	Adsorción Física
S10-P35Ag	S10	-	P35Ag	2,67	Adsorción Física
S10-P22Ag	S10	-	P22Ag	3,02	Adsorción Física
S8C1-Hom	S8C1	Carboxilo	Homogenato	1,28	Unión Covalente
S8C1-P35Ag	S8C1	Carboxilo	P35Ag	3,04	Unión Covalente
S8C1-P22Ag	S8C1	Carboxilo	P22Ag	2,59	Unión Covalente
S8C2- Hom	S8C2	Carboxilo	Homogenato	1,29	Unión Covalente
S8C2-P35Ag	S8C2	Carboxilo	P35Ag	3,43	Unión Covalente
S8C2-P22Ag	S8C2	Carboxilo	P22Ag	2,93	Unión Covalente
S10C1- Hom	S10C1	Carboxilo	Homogenato	1,64	Unión Covalente
S10C1-P35Ag	S10C1	Carboxilo	P35Ag	3,36	Unión Covalente
S10C1-P22Ag	S10C1	Carboxilo	P22Ag	2,75	Unión Covalente
S10C2- Hom	S10C2	Carboxilo	Homogenato	1,24	Unión Covalente
S10C2-P35Ag	S10C2	Carboxilo	P35Ag	2,77	Unión Covalente
S10C2-P22Ag	S10C2	Carboxilo	P22Ag	2,65	Unión Covalente
S13C1-P22Ag	S13C1	Carboxilo	P22Ag	1,64	Unión Covalente
S8E1-P22Ag	S8E1	Epoxi	P22Ag	1,56	Unión Covalente

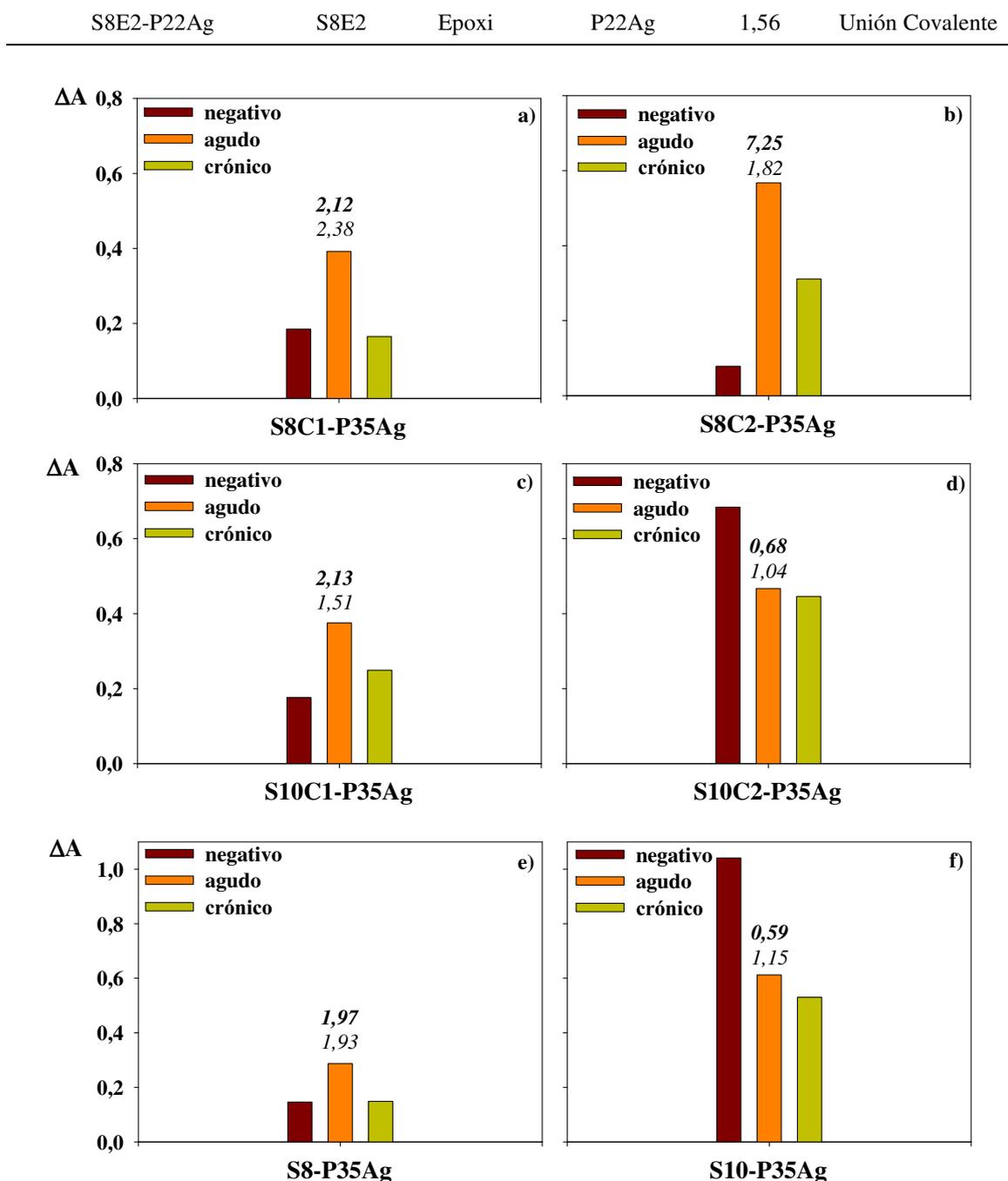


Figura 5.7. Resultados del ensayo de inmunoaglutinación con sueros controles para 6 CLP obtenidos por UC y AF de P35Ag (con similar $\Gamma_{P35Ag} = 2,67-3,43 \text{ mg/m}^2$). Se representa el cambio de absorbancia (ΔA) observado a los 5 minutos de mezclar el CLP con los sueros negativo, agudo o crónico. Los números sobre las barras indican las relaciones $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$ (negrita) y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$. Complejos S8C1-P35Ag (a), S8C2-P35Ag (b), S10C1-P35Ag (c), S10C2-P35Ag (d), S8-P35Ag (e) y S10-P35Ag (f).

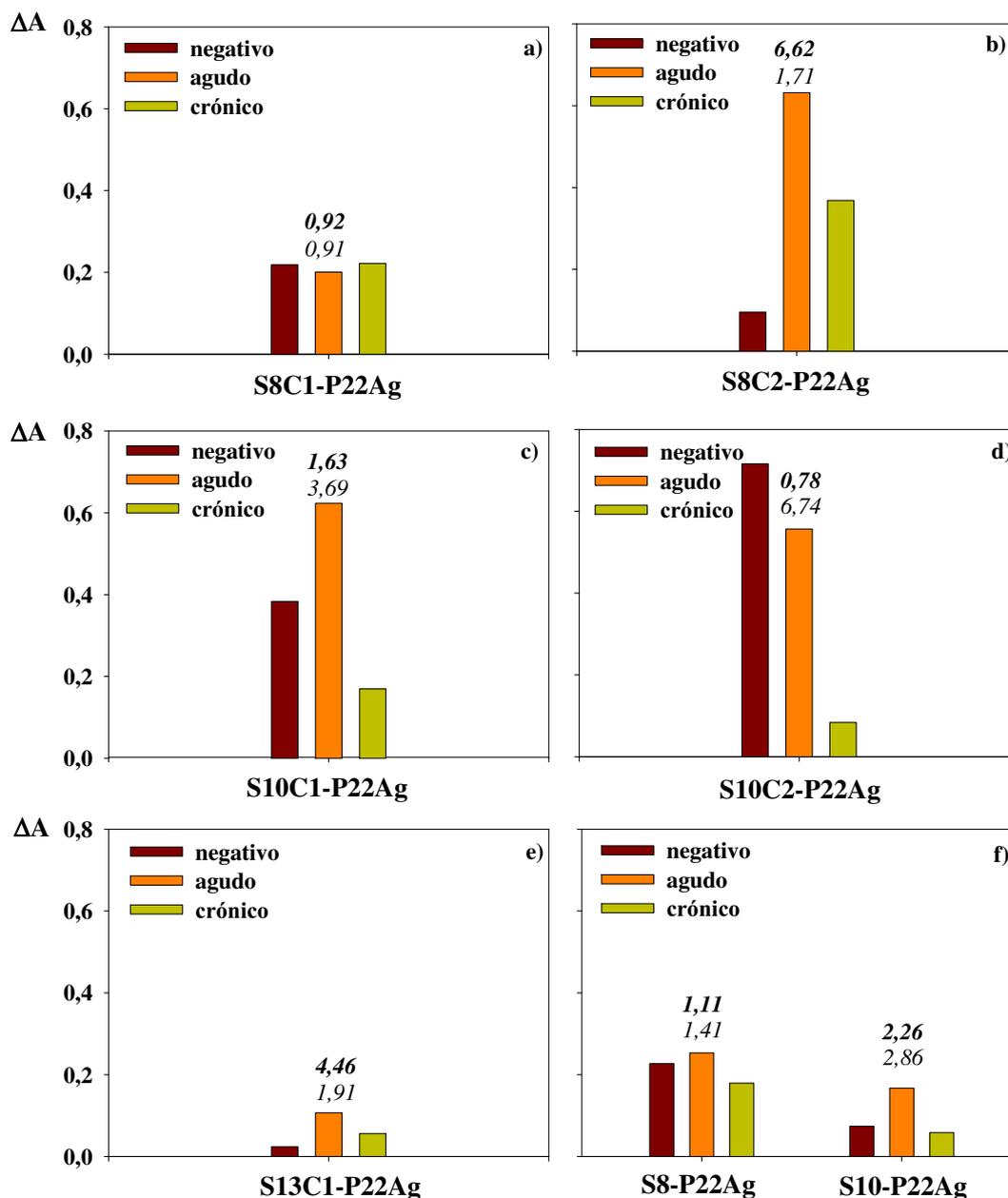


Figura 5.8. Resultados del ensayo de inmunoaglutinación con sueros controles para 6 CLP obtenidos por UC y AF de P22Ag (con similar $\Gamma_{P22Ag} = 2,59-3,02 \text{ mg/m}^2$). Se representa el cambio de absorbancia (ΔA) observado a los 5 minutos de mezclar el CLP con los sueros negativo, agudo o crónico. Los números sobre las barras indican las relaciones $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$ (negrita) y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$. Complejos S8C1-P22Ag (a), S8C2-P22Ag (b), S10C1-P22Ag (c), S10C2-P22Ag (d), S13C1-P22Ag (e) y S8-P22Ag y S10-P22Ag (f).

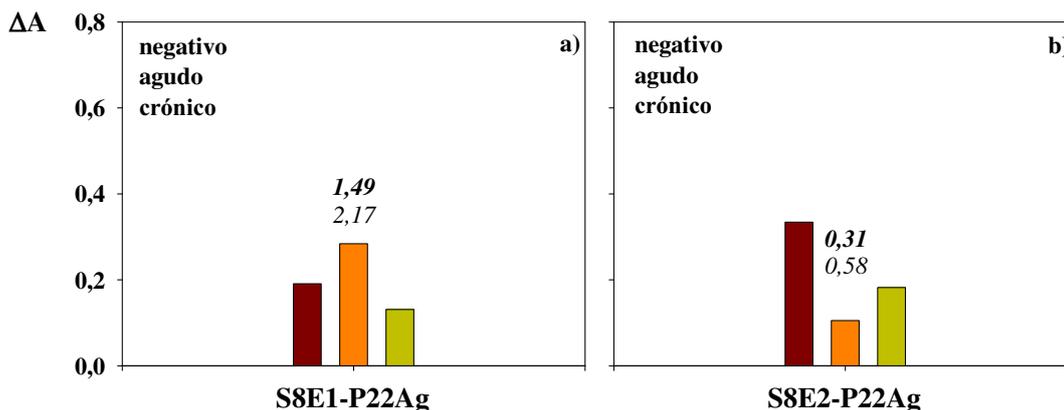


Figura 5.9. Resultados del ensayo de inmunoaglutinación con sueros controles para 2 CLP obtenidos por UC de P22Ag sobre los látex epoxidados S8E1 y S8E2 (con similar $\Gamma_{P22Ag} = 1,56 \text{ mg/m}^2$). Se representa el cambio de absorbancia (ΔA) observado a los 5 minutos de mezclar el CLP con los sueros negativo, agudo o crónico. Los números sobre las barras indican las relaciones $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$ (negrita) y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$. Complejos S8E1-P22Ag (a) y S8E2-P22Ag (b).

Seis CLP obtenidos con el antígeno P35Ag se evaluaron para determinar la influencia del tamaño y de la densidad de carga sobre su comportamiento como reactivo de IA (Fig. 5.7). Cuando se compararon los CLP obtenidos por la UC de la proteína sobre los látex carboxilados S8C1 y S8C2, se observó que el mayor valor de ΔA correspondió al CLP S8C2-P35Ag cuando se enfrentó con el suero control agudo (Fig. 5.7b). Nótese que en este caso, los valores de las relaciones entre los diferentes sueros fueron $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg} = 7,25$ y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr} = 1,82$. Esto demuestra una buena discriminación de los sueros agudos, respecto a los crónicos y negativos, indicando que los Ac generados en la fase aguda fueron reconocidos de manera diferencial. Para los CLP de menor tamaño de partícula (S10C1-P35Ag y S10C2-P35Ag) la mayor discriminación se observó en el caso del CLP S10C1-P35Ag, resultando $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg} = 2,13$ y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr} = 1,51$ (Fig. 5.7c). Se debe observar que en ambos casos, los mejores resultados se obtuvieron con los CLP producidos a partir de los látex que exhibieron mayores valores de c.c.c. y densidades de carga superficial, lo que indica que las propiedades del látex base tienen gran influencia en el comportamiento de los CLP como reactivos de IA. En los látex con menores densidades de carga superficial (S8C1 y S10C2) el cambio de A frente a los sueros negativos fue mayor, posiblemente debido al carácter más hidrofóbico y a los menores valores de c.c.c. de los CLP obtenidos a partir

de estos látex, lo que podría aumentar la posibilidad de interacciones inespecíficas con los distintos componentes del suero.

Además, cuando se compararon los tamaños de partícula de los CLP, se observó que el mejor rendimiento, en las condiciones experimentales ensayadas en esta Tesis, lo exhibió el de diámetro medio de partícula del orden de 350 nm (S8C2-P35Ag). Se debe notar que las condiciones del medio optimizadas para el CLP S8C2-P35Ag podrían no ser las más adecuadas para todos los casos evaluados, por lo tanto es de esperar que los CLP obtenidos a partir de otros látex requieran que ciertas variables se optimicen para cada caso en particular, como por ejemplo las condiciones del medio, concentración de CLP, concentración de suero y longitud de onda de la determinación.

Cuando se estudiaron los CLP obtenidos por la AF de la proteína sobre los látex de PS S8 y S10, se obtuvo un comportamiento aceptable en el caso del S8-P35Ag ($\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg} = 1,97$ y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr} = 1,93$; Fig. 5.7e). Sin embargo, el comportamiento fue en general mejor con los complejos obtenidos por UC.

En algunos casos, como por ejemplo los CLP S10C2-P35Ag y S10-P35Ag, los valores de ΔA registrados frente al suero negativo fueron muy elevados, indicando que estos CLP no serían útiles, bajo las condiciones experimentales estudiadas, como reactivos de IA. Estos resultados podrían explicarse observando la estabilidad de estos CLP, cuyos valores de c.c.c. fueron muy bajos (Tablas 4.1 y 4.2). Además, se debe tener en cuenta que cuando el CLP se mezcla con una muestra de suero, cuya composición es muy compleja, podrían ocurrir aglutinaciones inespecíficas que invalidan el ensayo.

Cuando se analizaron los resultados obtenidos con los CLP sintetizados a partir de la proteína recombinante P22Ag, se observaron consistencias con el caso anterior de P35Ag, en el sentido que los mayores valores de $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$ y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$ los exhibieron los complejos obtenidos a partir de los látex S8C2 y S10C1. Dichas relaciones resultaron $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg} = 6,62$ y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr} = 1,71$ para el CLP S8C2-P22Ag (Fig. 5.8b) y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg} = 1,63$ y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr} = 3,69$ para el CLP S10C1-P22Ag (Fig. 5.8c). Además, como se observó previamente, el CLP de tamaño de partícula cercano a 350 nm presentó mejores resultados que el de menor tamaño. Nótese que el CLP S10C1-P22Ag exhibió buena discriminación entre el suero agudo y el crónico, aunque ante el suero negativo mostró un elevado ΔA que podría deberse a aglutinaciones inespecíficas. Por otro lado, con el CLP obtenido a partir del látex de mayor tamaño de partícula, S13C1

(Fig. 5.8e), se observaron valores muy bajos de ΔA para todos los sueros. Esto podría deberse a la menor cantidad de proteína unida en comparación a los demás CLP y a que las condiciones experimentales ensayadas no sean las más adecuadas para este tamaño de partícula. Según Molina-Bolívar y Galisteo-González (2005), en turbidimetría se requiere mayor número de partículas que en otras técnicas de dispersión de luz, como por ejemplo nefelometría. En nuestro caso, para alcanzar el mismo valor de A inicial con el CLP S13C1-P22Ag que con los demás CLP, el número de partículas empleado fue mucho menor, lo que podría haber influido en las bajas señales detectadas. Además, cuando el diámetro de partícula supera los 400 nm, se sugiere emplear longitudes de onda de la región infrarroja del espectro electromagnético, es decir mayores a los 750 nm (Sorin y col., 1989).

Respecto de los CLP obtenidos a partir de los látex epoxidados, sólo el S8E1-P22Ag logró discriminar, aunque levemente, el suero agudo respecto del suero negativo y del crónico.

Se observó que algunos complejos no serían aptos como reactivos de IA, debido al gran valor de ΔA que mostraron frente al suero negativo (S8C1-P22Ag, S8E2-P22Ag y S10C2-P22Ag). Nuevamente, este hecho podría explicarse observando los valores de c.c.c. de dichos complejos (Tabla 4.3) y/o deberse a las posibles interferencias del suero.

Si se comparan los valores de las c.c.c. de los CLP S8C1-P35Ag y S8C1-P22Ag, se observa que en el primer caso el valor de c.c.c. determinado por el método visual fue de 600 mM de BrK frente a 300 mM de BrK en el segundo caso. Como se mencionó previamente, el primer CLP presentó buen comportamiento en el ensayo de IA (Fig. 5.7a) mientras que el segundo no sería útil como reactivo de IA (Fig. 5.8a), demostrando la influencia de la estabilidad de los CLP en su comportamiento en los ensayos de IA.

Finalmente, a partir de los resultados de la Fig. 5.10 se observa que el comportamiento de los CLP obtenidos a partir del homogenato del *T. gondii* fue pobre. En algunos casos la variación de A frente al suero agudo fue superior que frente al suero negativo y frente al suero crónico (S8C1-Hom, S8C2-Hom y S10-Hom), sin embargo este comportamiento no está relacionado con la especificidad del Ag empleado. El homogenato, al ser un lisado total del parásito, incluye Ag que no son específicos de la

fase aguda de la enfermedad, por lo que los CLP obtenidos en este trabajo no resultan reactivos adecuados para ensayos de IA de acuerdo a los propósitos aquí planteados.

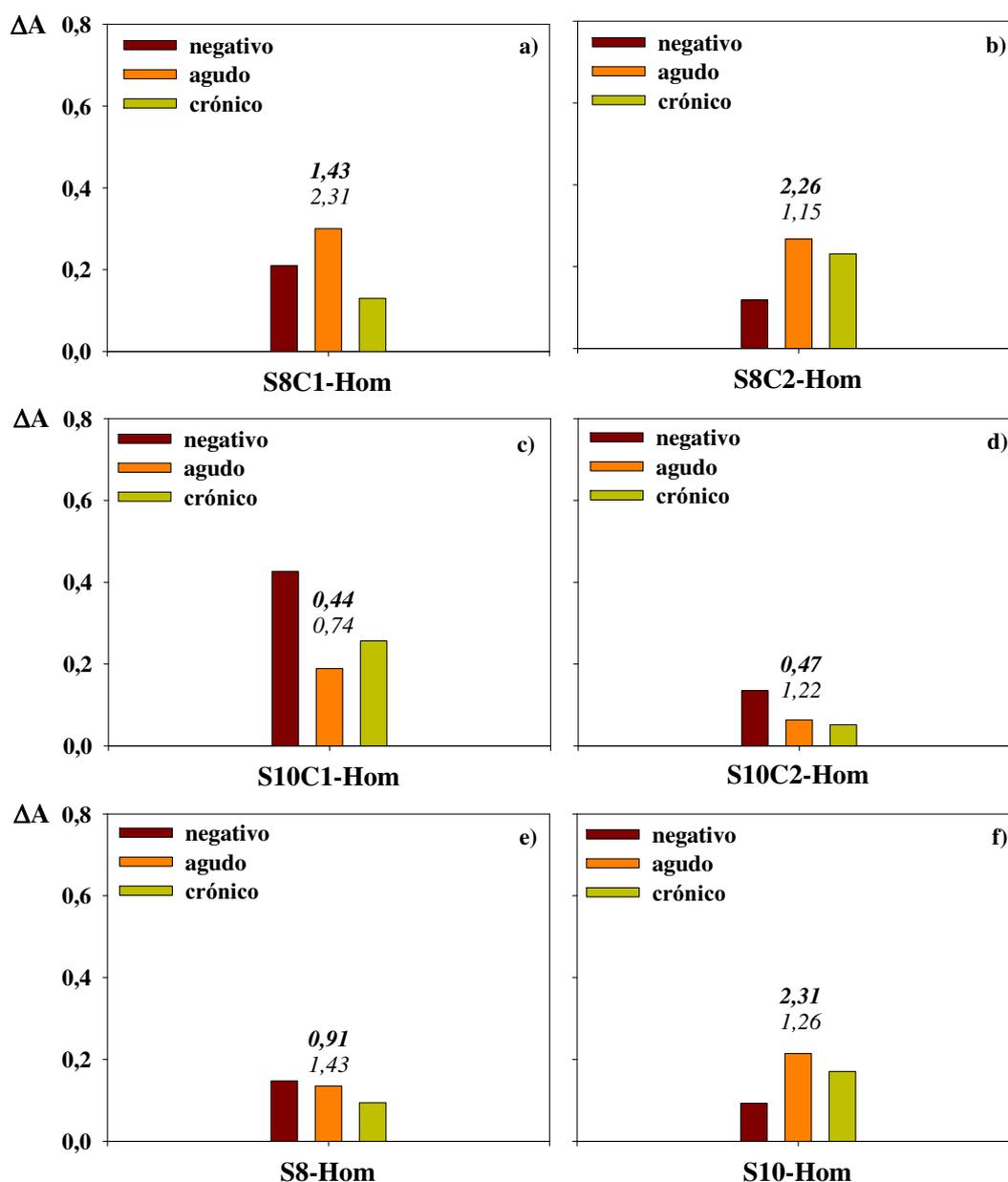


Figura 5.10. Resultados del ensayo de inmunoaglutinación con sueros controles para 6 CLP obtenidos por UC y AF del homogenato del *T. gondii* ($\Gamma_{Hom} = 1,24-2,26 \text{ mg/m}^2$). Se representa el cambio de absorbancia (ΔA) observado a los 5 minutos de mezclar el CLP con los sueros negativo, agudo o crónico. Los números sobre las barras indican las relaciones $\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$ (negrita) y $\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$. Complejos S8C1-Hom (a), S8C2-Hom (b), S10C1-Hom (c), S10C2-Hom (d), S8-Hom (e) y S10-Hom (f).

Se debe tener en cuenta que en ELISA se produce una interacción primaria entre el Ag y el Ac, mientras que en el ensayo de IA se necesita de una interacción secundaria (Abbas y col., 1997). En el proceso de aglutinación, el Ac (que debe ser bivalente) interacciona en primer lugar con un Ag anclado a una partícula de látex y luego debe interaccionar con otro Ag de una segunda partícula. Posteriormente, un segundo Ac debe interaccionar con un Ag anclado a una de las partículas anteriores y al mismo tiempo con un Ag de una tercera partícula (Fig. 5.1). La propagación de estas interacciones da lugar a la formación de la red de aglutinación. Para que ello ocurra, las partículas sensibilizadas con Ag, y los Ac deben estar presentes en concentraciones óptimas, en lo que se denomina zona de equivalencia. Tanto con un exceso de Ac, como de Ag, la aglutinación no ocurre. La compleja composición del homogenato del parásito dificulta la reacción de aglutinación ya que la probabilidad de que un Ac se una a Ag ubicados en partículas diferentes es menor en este caso, mientras que cuando los Ag unidos a las partículas son iguales, como en el caso de las proteínas recombinantes, esta probabilidad es mayor. Por otro lado, la variabilidad en diferentes lotes de producción podría dar lugar a interacciones inespecíficas, lo que podría impedir la formación de la red de aglutinación en las condiciones ensayadas en este trabajo.

5.2.3. Ensayos de Inmunoaglutinación Frente a un Panel de Sueros

Los CLP que presentaron mejores resultados frente a los sueros controles para discriminar el suero control agudo respecto del crónico y del negativo fueron evaluados frente a un panel de sueros, constituido por 15 sueros negativos, 10 sueros agudos y 15 sueros crónicos. Los CLP estudiados fueron: a) S8C2-P35Ag, S8C2-P22Ag y S8C2-Hom, los tres obtenidos a partir del látex con funcionalidad carboxilo S8C2 y b) S8E1-P22Ag, obtenido a partir del látex con funcionalidad epoxi S8E1, para comparar tanto el efecto de la proteína antigénica unida, como del tipo de grupo funcional, sobre el comportamiento del reactivo de IA. Se debe notar en este punto que el panel de sueros empleado, con los sueros correctamente clasificados, en volumen suficiente y en condiciones para ser utilizados en los ensayos de IA, resultó difícil de obtener, lo que justifica el número limitado de sueros empleados.

La habilidad de los CLP para discriminar los sueros agudos se analizó mediante curvas ROC. Debido a que el objetivo del presente trabajo es el diagnóstico de la Toxoplasmosis recientemente adquirida, en la construcción de las curvas ROC se tomaron los siguientes grupos: i) sueros agudos (n=10) y ii) sueros crónicos + negativos (n=30).

Además, como el propósito del kit de IA es su empleo en estudios de tamizajes, el valor de corte o “*cut-off*” fue seleccionado tal que la S del test fuera del 100 %. Esto implica que no existirían resultados falsos negativos, es decir que ningún suero agudo sería clasificado como negativo o como crónico. En una etapa posterior, todos los sueros clasificados como positivos por IA deberían evaluarse con técnicas de referencia como IFI, ELISA IgM, y avidez de IgG para confirmar si se trata o no de una infección aguda.

En las Figs. 5.11 a 5.13 se muestran las distribuciones de ΔA y las respectivas curvas ROC para 3 CLP (obtenidos a partir de los látex carboxilados) evaluados frente al panel de sueros.

Uno de los parámetros más importantes de una curva ROC en el estudio de test diagnósticos es el AUC, que brinda información sobre la discriminación entre las poblaciones analizadas de manera independiente del valor de corte seleccionado. Este área varía entre 0,5 y 1. Si $AUC = 1$, la discriminación es perfecta; mientras que si $AUC = 0,5$, la discriminación es totalmente aleatoria. Según la clasificación propuesta por Swets y Pickett (1982), si el valor de AUC se encuentra entre 0,5 y 0,7, la discriminación diagnóstica del test es mala; si el valor de AUC se encuentra entre 0,7 y 0,9, el test podría ser útil en algunos casos; mientras que valores mayores a 0,9 indican un buen desempeño diagnóstico.

Cuando se evaluó el CLP S8C2-P35Ag, se obtuvo $AUC = 0,9564$, indicando que la discriminación entre los grupos analizados fue muy buena. Cuando se evaluó el CLP S8C2-P22Ag, resultó $AUC = 0,9259$, lo que es indicio que este complejo también sería buen reactivo de IA para detectar Toxoplasmosis recientemente adquirida. Sin embargo, y como era de esperarse, cuando se evaluó el CLP S8C2-Hom se observó $AUC = 0,7733$, lo cual confirma que este Ag no cumple con los objetivos del presente trabajo.

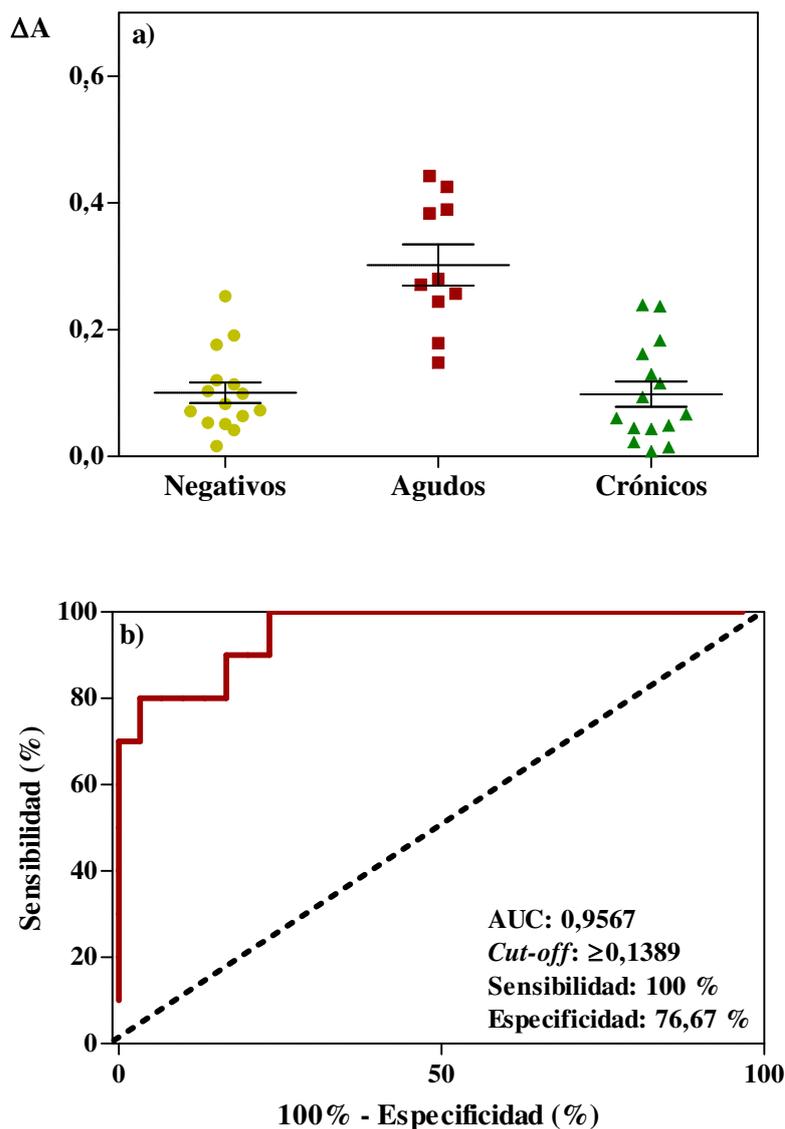


Figura 5.11. Resultados del ensayo de inmunoaglutinación cuando se evaluó el CLP S8C2-P35Ag frente a un panel de sueros negativos, agudos y crónicos. a) Distribución de ΔA . b) Curva ROC construida entre los siguientes grupos: i) sueros agudos (n=10) y ii) sueros negativos + crónicos (n=30).

Ambas proteínas recombinantes mostraron ser buenos Ag para discriminar los sueros agudos respecto a los negativos y crónicos. Cuando se analizaron las curvas ROC de los CLP S8C2-P35Ag (Fig. 5.11b) y S8C2-P22Ag (Fig. 5.12b) se encontró que ambos reactivos exhibieron resultados similares. Así, cuando se consideró un valor de $cut-off \geq 0,1389$ para el CLP S8C2-P35Ag y un valor de $cut-off \geq 0,1632$ para el CLP S8C2-P22Ag, la E de los ensayos fue de 76,67 % y 73,33 %, respectivamente.

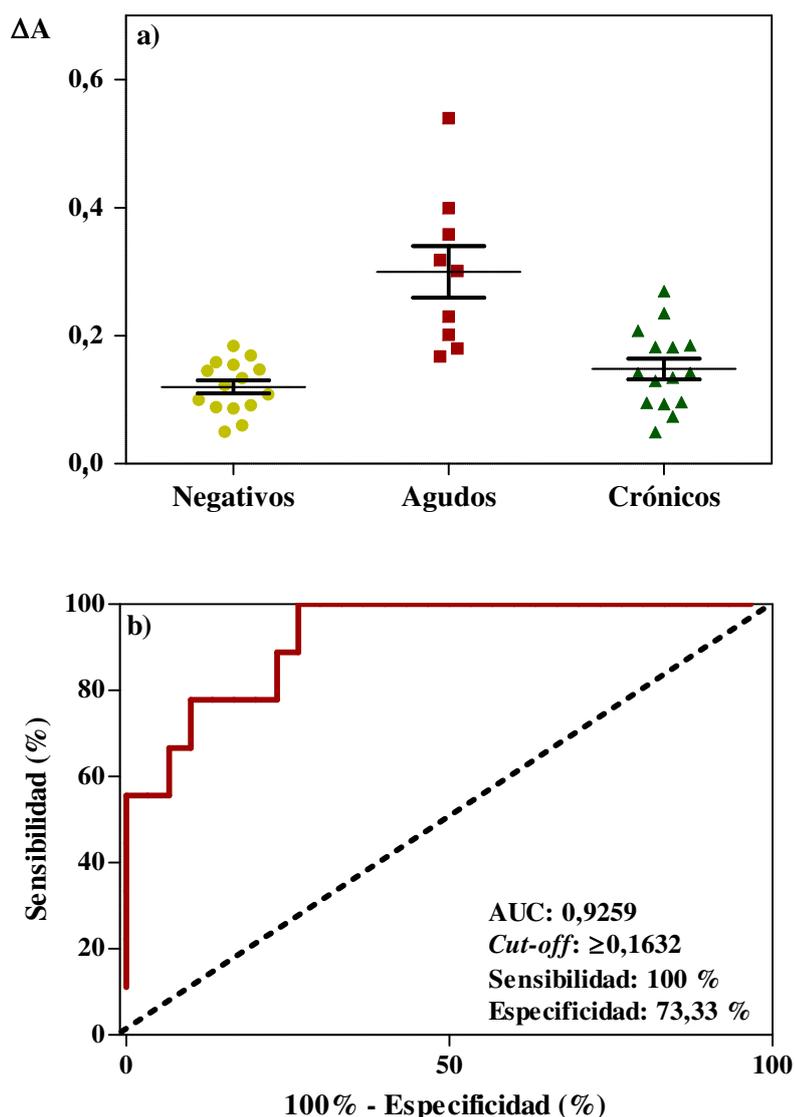


Figura 5.12. Resultados del ensayo de inmunoaglutinación cuando se evaluó el CLP S8C2-P22Ag frente a un panel de sueros negativos, agudos y crónicos. a) Distribución de ΔA . b) Curva ROC construida entre los siguientes grupos: i) sueros agudos (n=10) y ii) sueros negativos + crónicos (n=30).

En la Fig. 5.14 se muestran las distribuciones de $\Delta A/cut-off$ para los 3 CLP evaluados previamente. Se puede observar que los CLP obtenidos a partir del homogenato del *T. gondii* presentaron valores de ΔA_{ag} y ΔA_{cr} similares, sin lograr su diferenciación. Esto se debe a que el Ag no presenta especificidad hacia los sueros agudos, debido a su composición indefinida. Con respecto a los CLP obtenidos a partir de las proteínas recombinantes, se observaron menores valores de ΔA_{cr} y mayores

valores de ΔA_{ag} , lográndose mejorar la discriminación de los sueros agudos, respecto de los crónicos y negativos. Cuando se comparan los 2 Ag recombinantes, P35Ag y P22Ag, se observa que para el CLP S8C2-P35Ag, si bien más sueros negativos presentaron señales superiores al “*cut-off*” comparado con los otros CLP, la discriminación de los sueros agudos respecto de los crónicos y negativos fue mayor. Esto es debido a que el valor medio de ΔA_{ag} fue mayor, y el valor medio de ΔA_{cr} fue menor, que para el CLP S8C2-P22Ag.

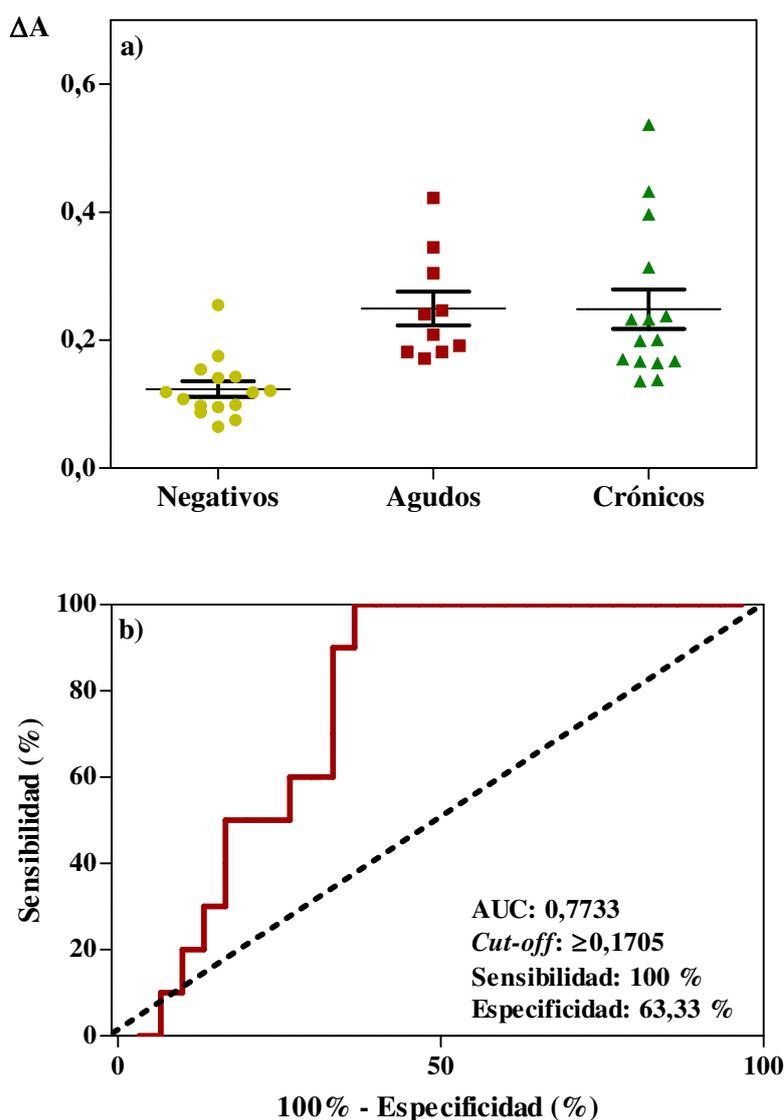


Figura 5.13. Resultados del ensayo de inmunoaglutinación cuando se evaluó el CLP S8C2-Hom frente a un panel de sueros negativos, agudos y crónicos. a) Distribución de ΔA . b) Curva ROC construida entre los siguientes grupos: i) sueros agudos (n=10) y ii) sueros negativos + crónicos (n=30).

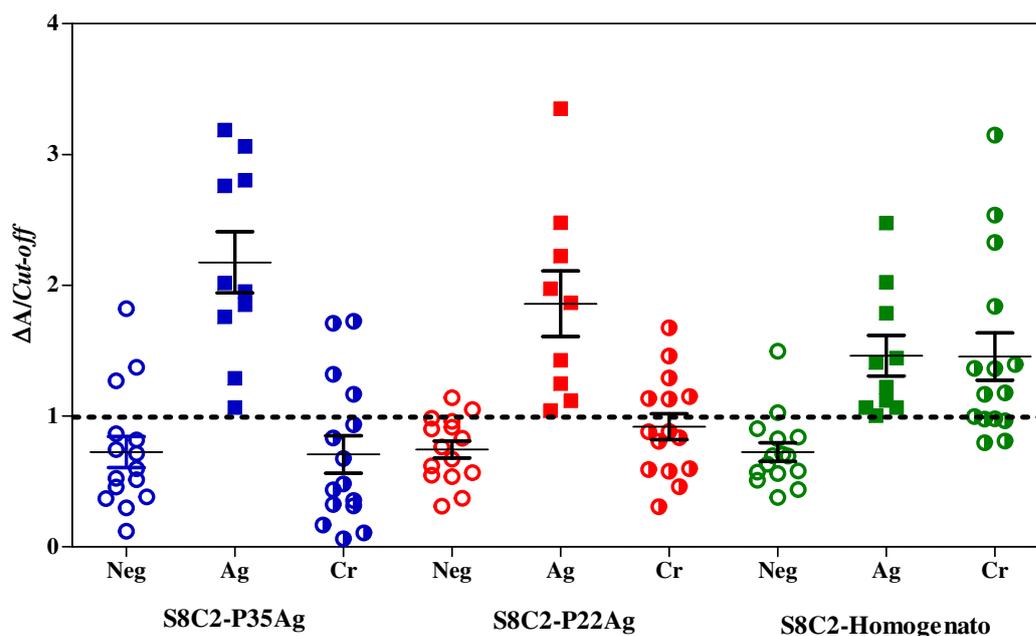


Figura 5.14. Comparación entre las distribuciones relativas ($\Delta A/cut-off$) obtenidas cuando se evaluaron los 3 CLP seleccionados (S8C2-P35Ag, S8C2-P22Ag y S8C2-Hom) frente a un panel de sueros. La línea de puntos indica $\Delta A/cut-off = 1$.

Para comparar la influencia del tipo de funcionalidad química presente en la superficie de las partículas se evaluó, frente al mismo panel de sueros, un CLP obtenido a partir del látex epoxidado S8E1 y de la proteína recombinante P22Ag. En la Fig. 5.15 se presenta la distribución de ΔA y la respectiva curva ROC para el CLP S8E1-P22Ag.

El rendimiento de este CLP fue menos satisfactorio que el del CLP obtenido a partir del látex carboxilado S8C2 y de la misma proteína antigénica (Fig. 5.12). De la comparación entre ambos reactivos se observó que con S8E1-P22Ag se obtuvo $AUC = 0,8667$, que es menor que el obtenido a partir del S8C2-P22Ag ($AUC = 0,9259$). Además, la E del ensayo también fue menor para el complejo resultante del látex epoxidado e igual al 60%, para el valor de $cut-off \geq 0,1863$.

Finalmente, en la Fig. 5.16 se muestran las distribuciones de $\Delta A/cut-off$ para los CLP S8C2-P22Ag y S8E1-P22Ag. Se puede observar que el CLP obtenido a partir del látex epoxidado presentó un valor medio de ΔA_{ag} menor, y un valor medio de ΔA_{cr} mayor (y superior al valor de “ $cut-off$ ”), que el CLP obtenido a partir del látex

carboxilado, lo que influyó en el menor valor de AUC y E obtenidos para el CLP S8E1-P22Ag.

El menor rendimiento de S8E1-P22Ag podría deberse a la menor cantidad de Ag unido a la superficie de las partículas ($\Gamma_{P22Ag} = 1,56 \text{ mg/m}^2$), comparado con el CLP S8C2-P22Ag ($\Gamma_{P22Ag} = 2,93 \text{ mg/m}^2$). Por lo tanto, se deberían obtener CLP a partir del látex S8E1 con mayor cantidad de P22Ag acoplado a su superficie, a fin de poder realizar esta comparación empleando CLPs que presenten similares valores de Γ .

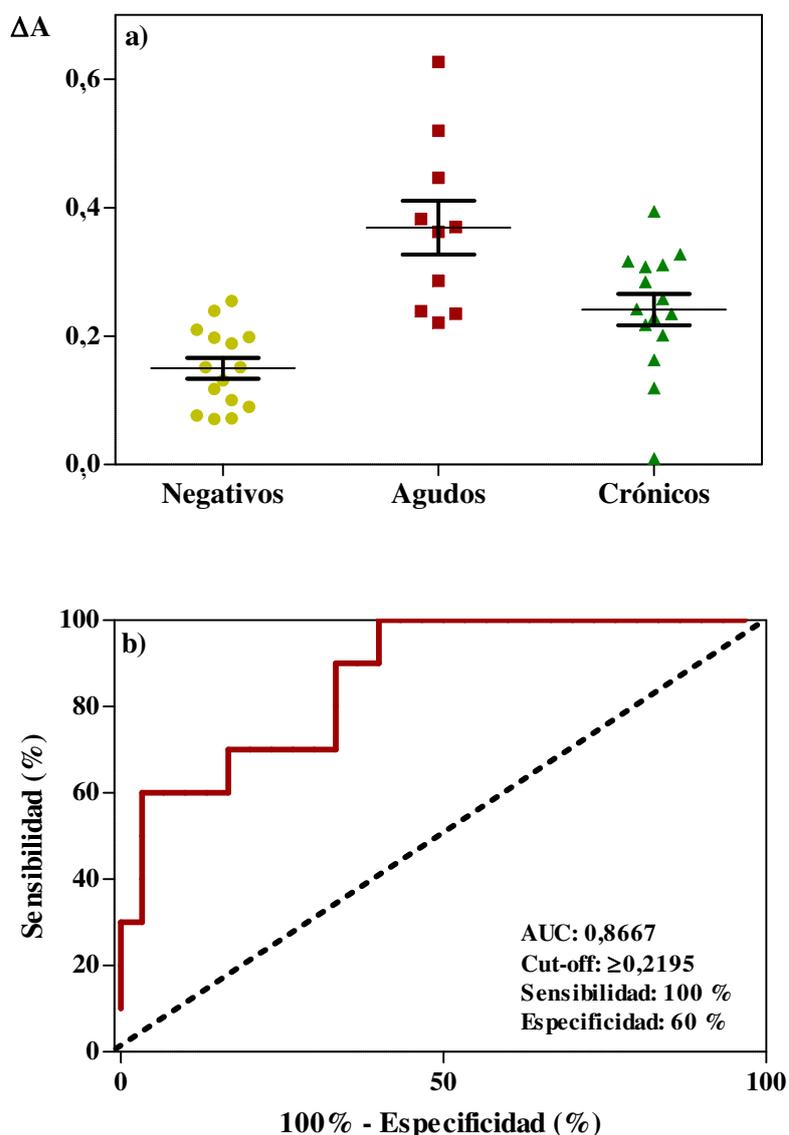


Figura 5.15. Resultados del ensayo de inmunoaglutinación cuando se evaluó el CLP S8E1-P22Ag frente a un panel de sueros negativos, agudos y crónicos. a) Distribución de ΔA . b) Curva ROC construida entre los siguientes grupos: i) sueros agudos (n=10) y ii) sueros negativos + crónicos (n=30).

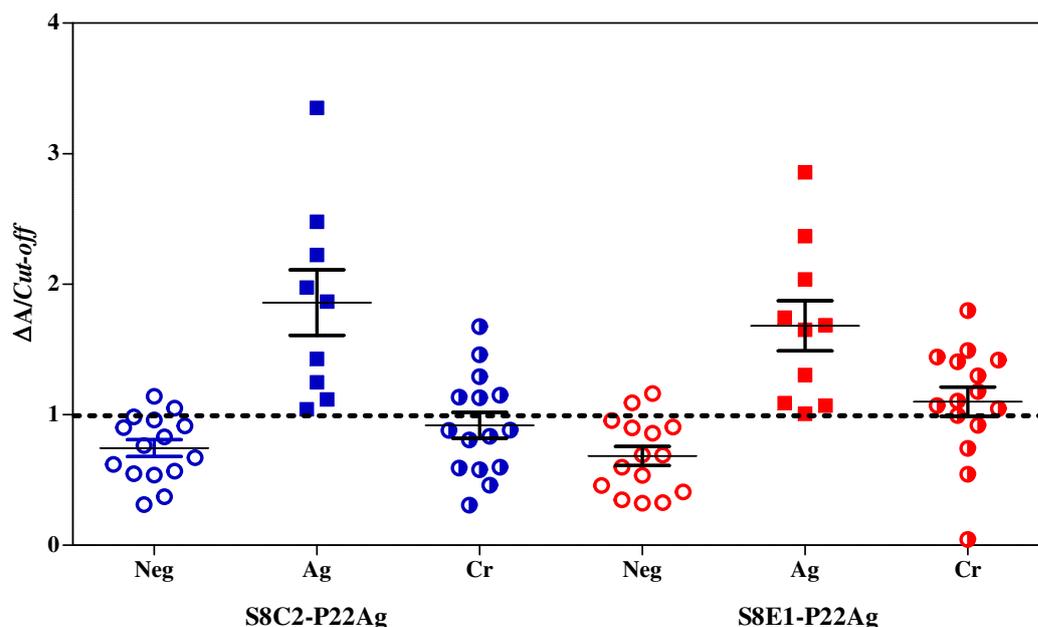


Figura 5.16. Comparación entre las distribuciones relativas ($\Delta A/cut-off$) obtenidas cuando se evaluaron los CLP S8C2-P22Ag y S8E1-P22Ag frente a un panel de sueros. La línea de puntos indica $\Delta A/cut-off = 1$.

5.3. CONCLUSIONES

En este Capítulo se evaluaron los CLP previamente sintetizados como reactivos de IA para detectar Ac específicos de la fase aguda de la Toxoplasmosis. En primer lugar se estudiaron las condiciones del inmunoensayo frente a sueros controles, observándose lo siguiente:

- La mayor discriminación del suero control agudo, respecto del crónico y del negativo se obtuvo trabajando a baja fuerza iónica, en presencia de glicina y PEG 8000 en el buffer de reacción.
- Los CLP obtenidos a partir de los látex carboxilados de mayores densidades de grupos carboxilos (S8C2 y S10C1) presentaron mejores resultados en los inmunoensayos que los de menores densidades de grupos funcionales (S8C1 y S10C2).
- Los CLP sintetizados a partir de los látex de diámetro cercano a 350 nm mostraron una mayor capacidad de discriminación del suero agudo con respecto al crónico y al negativo. En el caso de los CLP obtenidos a partir de los látex de tamaños

de partícula mayores (S13C1) y menores (S10C1 y S10C2) deberían optimizarse las condiciones experimentales de la reacción de IA para cada caso, antes de poder realizar una comparación adecuada que permita concluir sobre el efecto del tamaño de las partículas.

- Los complejos obtenidos en los experimentos de UC permitieron obtener mejores resultados que los complejos obtenidos por AF. Éstos últimos serían más sensibles a los cambios en el medio de reacción (pH y fuerza iónica), y las proteínas adsorbidas podrían sufrir desorciones y/o modificaciones en su estructura, alterando su capacidad antigénica.

Una vez establecidas las condiciones del buffer de reacción, se evaluaron los CLP sintetizados por UC de los 3 Ag estudiados al látex S8C2, y de P22Ag sobre el látex S8E1, frente a un panel de 15 sueros negativos, 10 sueros agudos y 15 sueros crónicos, observándose lo siguiente:

- De las distribuciones de ΔA y del análisis de las curvas ROC obtenidas, se destaca que las 2 proteínas recombinantes fueron más reactivas frente a los sueros agudos, con altos valores de AUC ($>0,9$), indicando que los CLP S8C2-P35Ag y S8C2-P22Ag serían capaces de discriminar los sueros agudos respecto de los crónicos y negativos; y que podrían ser de utilidad como reactivos de IA para detectar sueros con Toxoplasmosis aguda, principalmente en estudios de tamizajes. En cambio, con el homogenato del parásito las distribuciones de ΔA para los sueros agudos y crónicos fueron similares, evidenciándose su incapacidad para discriminar entre estos grupos.

- El CLP obtenido a partir del látex carboxilado S8C2 y de la proteína P22Ag presentó un rendimiento mayor que el CLP obtenido a partir del látex epoxidado S8E1, siendo los valores de AUC y E superiores para el CLP S8C2-P22Ag. Esto podría deberse a la mayor cantidad de Ag unido a la superficie de las partículas en el CLP S8C2-P22Ag ($\Gamma_{P22Ag} = 2,93 \text{ mg/m}^2$) que en el CLP S8E1-P22Ag ($\Gamma_{P22Ag} = 1,56 \text{ mg/m}^2$). Por lo tanto, se debería obtener un CLP a partir del látex S8E1 con mayor cantidad de P22Ag acoplado a su superficie, a fin de poder realizar esta comparación empleando CLPs que presenten similares valores de Γ .

Finalmente, los resultados aquí presentados deberían ser validados ante un panel de sueros más amplio.

CAPÍTULO 6:

Conclusiones y Propuestas para Trabajos Futuros

6.1. INTRODUCCIÓN

La síntesis controlada de partículas poliméricas despierta un gran interés ya que se pueden obtener látex con características bien definidas, como distribución de tamaños de partícula, tipo y densidad de grupos superficiales. Se las puede aplicar en el campo de la biomedicina como soportes de biomoléculas (proteínas, enzimas, etc.). En este campo, se incluyen los látex para inmunoensayos, y en particular, los utilizados en los test de inmunoaglutinación (IA), que permiten amplificar la reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), siendo herramientas diagnósticas simples, rápidas y económicas.

El objetivo del presente trabajo de Tesis Doctoral fue diseñar complejos látex-proteína (CLP) que puedan ser aplicados en ensayos de IA para detectar Toxoplasmosis recientemente adquirida. Para ello se consideraron cuatro etapas. La primera de ellas, implicó la síntesis controlada y la caracterización de partículas de látex de diferentes tamaños y con densidades de carga superficial variable. La segunda etapa consistió en la obtención de las proteínas antigénicas; para lo cual, por un lado se expresaron y purificaron 2 Ag recombinantes de fase aguda del *Toxoplasma gondii*; y por otro se obtuvo el homogenato del parásito. La tercera etapa consistió en la obtención y caracterización de los CLP, mediante la interacción física y/o química entre los Ag y la superficie de las partículas. La cuarta y última etapa consistió en la aplicación de los distintos CLP en ensayos de IA frente a un panel de sueros, para analizar su capacidad para detectar Ac específicos de la fase aguda de la enfermedad.

A continuación, se resaltan los resultados más importantes obtenidos, y se sugieren posibles tareas futuras de investigación.

6.1.1. Síntesis de las Partículas Poliméricas

Se realizó la síntesis de partículas “cuasi-monodispersas” de látex de poliestireno (PS) de tamaño variable utilizando distintas metodologías. Mediante polimerización en emulsión se obtuvieron partículas en el rango 85-300 nm, empleando concentraciones crecientes de emulsificante para obtener látex con diámetros de partícula decreciente. Mediante polimerización en dispersión se obtuvieron partículas con diámetros superiores a 1000 nm.

Luego, se realizó la síntesis de partículas tipo “core-shell” con funcionalidad carboxilo mediante un proceso de copolimerización en emulsión de estireno (St) y ácido metacrílico (MAA) sobre siembras de PS de diferentes tamaños sintetizadas previamente. Se modificó la relación MAA/St para obtener partículas con densidades de carga y de grupos superficiales variables. En un caso, se realizó un agregado impulsional de iniciador para aumentar la concentración de radicales libres en la fase acuosa, logrando aumentar la conversión y la densidad de carga superficial del látex, comparado con los obtenidos por vía “batch” convencional.

Además, se realizó la síntesis de látex con funcionalidad epoxi mediante un proceso de copolimerización en emulsión de St y glicidil metacrilato (GMA) sobre una de las siembras de PS previamente sintetizadas. Se modificó la relación GMA/St, obteniéndose dos látex con distinta densidad de carga y de grupos funcionales superficiales. En ambos casos se realizó un pulso intermedio de iniciador, con el objeto de aumentar la conversión y densidad de carga superficial. Además, en una de las reacciones se realizó un agregado de monómeros, con el propósito de incorporar mayor cantidad de grupos epoxi a la superficie de las partículas.

Para el futuro, se sugiere continuar en el estudio de la funcionalización de partículas con grupos epoxi, a partir de siembras de PS de diferentes tamaños. Además, se sugiere estudiar políticas de operación alternativas 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 los Sistemas Coloidales

Luego de sintetizados los látex, se procedió a su limpieza y caracterización.

Se midieron los diámetros medios mediante dispersión de luz dinámica y la polidispersidad de la distribución de tamaños de partícula por microscopía electrónica. En general la polidispersidad fue baja y los látex aptos para su empleo como reactivos de IA.

Las partículas de látex presentaron distinta funcionalidad química superficial, proveniente de los grupos aportados por el iniciador y/o por los monómeros funcionales. Se determinó la densidad de carga, la naturaleza y densidad de grupos funcionales superficiales, y la estabilidad coloidal del sistema mediante la concentración crítica de coagulación (c.c.c.), la movilidad electroforética (μ_e) y el potencial Zeta (ζ).

La estabilidad coloidal determinada a través de la c.c.c., mostró una dependencia con el pH en el caso de los látex carboxilados. En general, la c.c.c. aumentó con la densidad de carga superficial y con la densidad de grupos carboxilo. Los altos valores de c.c.c. registrados en algunos casos suponen que la estabilidad coloidal en estos sistemas es fruto de una estabilización electroestérica. El efecto electrostático se debe a las cargas superficiales y el efecto estérico a las cadenas de polímero hidrofílico ancladas sobre la superficie de las partículas. La μ_e y el ζ aumentaron con el pH y disminuyeron con la densidad de grupos superficiales. A pH más altos la carga eléctrica de las partículas aumenta debido a que los grupos funcionales están más ionizados, aumentando μ_e . Cuanto mayor fue la densidad de grupos superficiales, mayor fue el espesor de la “hairy layer”, alejando el plano de deslizamiento de la superficie de las partículas y disminuyendo el ζ . Además, los látex con mayor densidad de carga presentaron menores valores de μ_e , posiblemente debido a que podría existir una condensación de iones en la superficie de las partículas producto de la gran carga que poseen.

En el futuro se sugiere validar la cuantificación de los grupos epoxi con técnicas alternativas a la valoración potenciométrica, basada en la reacción redox entre el grupo epoxi y el tiosulfato de sodio, empleada en esta Tesis.

6.1.3. Obtención de Antígenos del *Toxoplasma gondii*

Se trabajó con el homogenato del parásito, como así también con 2 proteínas recombinantes de fase aguda. Para la obtención de las proteínas recombinantes, denominadas P35Ag y P22Ag, se utilizaron células de *Escherichia coli* transformadas 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 Ni, obteniéndose proteínas antigénicas del *T. gondii* 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 profundizar en la caracterización de la estructura en solución de las proteínas recombinantes, mediante la aplicación de calorimetría diferencial de barrido, dicroísmo circular, fluorescencia o resonancia magnética nuclear.

6.1.4. Síntesis y Caracterización de los Complejos Látex-Proteína. Evaluación de la Antigenicidad de las Proteínas Unidas a las Partículas.

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 y epoxi superficiales.

En los experimentos de adsorción física de las proteínas recombinantes P35Ag y P22Ag sobre las diferentes partículas de látex se observó que las fuerzas predominantes en este proceso son fundamentalmente de naturaleza hidrofóbica, ya que a medida que aumentó la hidrofobicidad de la superficie de las partículas se incrementó la cantidad de proteína unida.

Cuando se compararon los resultados entre los diferentes antígenos (P35Ag, P22Ag y el homogenato del *T. gondii*) se observó una mayor cantidad de proteína unida por unidad de área superficial cuando se trabajó con las proteínas recombinantes; la menor cantidad de proteína unida cuando se empleó el homogenato del parásito podría

deberse a su composición indefinida, que incluye una mezcla de proteínas con diferentes tamaños, puntos isoeléctricos, y afinidad por la superficie de los látex.

En los experimentos de unión covalente de las proteínas recombinantes sobre los látex carboxilados, se observó que al aumentar la concentración de proteína adicionada, aumentó tanto la proteína total unida, como la acoplada luego del proceso de desorción con emulsificante (Tritón X-100). Por otro lado, la relación entre la proteína unida luego del proceso de desorción y la proteína adicionada, disminuyó al aumentar esta última, debido a la saturación de los grupos carboxilos superficiales. Además, cuanto mayor fue la densidad de grupos carboxilos superficiales, mayor fue la cantidad de proteína unida.

Cuando se evaluó el efecto del pH sobre la cantidad de P35Ag unida a los látex carboxilados se observó que el máximo acoplamiento se produjo cerca del pI de la proteína, debido a que en esta condición se minimizan las repulsiones inter- e intramoleculares, y también es mínima la repulsión entre la superficie de las partículas y las biomoléculas.

Con ambos Ag recombinantes (P35Ag y P22Ag) se observó que los látex carboxilados con mayores densidades de grupos funcionales permitieron un mayor acoplamiento covalente de proteínas. Con el homogenato del parásito se observaron menores valores de proteína unida, debido a su composición indefinida. Al incluir proteínas de diferentes tamaños, podría existir un impedimento estérico de las proteínas de mayor tamaño que pueden ocluir grupos reactivos de la superficie de la partícula. Además, las diferentes proteínas presentan distintas reactividades en función de su estructura en solución.

En la unión covalente de P22Ag sobre los látex con funcionalidad epoxi, la cantidad de proteína unida fue menor que la ligada a los látex carboxilados, lo que podría deberse a la menor densidad de grupos funcionales de los látex epoxidados.

En cuanto a la caracterización de los CLP, se observó que la estabilidad de los mismos está muy influenciada por las características de los látex sin sensibilizar. En general, la mayoría de los CLP mostraron ser estables en las condiciones en que se deben realizar los ensayos de IA.

Para los CLP obtenidos a partir de los látex de PS y de los látex epoxidados, los valores de c.c.c. a pH 8 fueron ligeramente mayores que para los látex sin sensibilizar, posiblemente debido a que a este pH las proteínas se encuentran con carga neta

negativa, aportando un nuevo elemento a la estabilidad del sistema. En cambio, en general, los látex carboxilados presentaron mayores valores de c.c.c. que sus CLP, probablemente debido a que buena parte de los grupos carboxilo (responsables de la estabilidad de los látex) reaccionaron con las biomoléculas.

En la evaluación de la antigenicidad de las proteínas acopladas a los látex, se observó que el proceso de sensibilización no modificó la funcionalidad biológica de las proteínas y que los CLP serían capaces de reconocer Ac específicos en ensayos de IA.

A futuro, se podría estudiar la conformación de las proteínas unidas a la superficie de las partículas y profundizar en el estudio de la sensibilización de las partículas con funcionalidad epoxi.

6.1.5. Aplicación de los Complejos Látex-Proteína en Ensayos de Inmunoaglutinación

Se evaluaron los CLP previamente sintetizados como reactivos de IA para detectar Ac específicos de la fase aguda de la Toxoplasmosis. La reacción de aglutinación se siguió por turbidimetría, midiéndose la absorbancia (A) a una longitud de onda de 570 nm.

Del análisis del comportamiento de los CLP frente a sueros controles negativos, agudos y crónicos se determinó que la mayor discriminación del suero control agudo, respecto del crónico y del negativo se obtuvo trabajando a baja fuerza iónica, en presencia de glicina y polietilenglicol 8000 en el buffer de reacción.

Se observó además que los CLP sintetizados a partir de los látex de diámetro cercano a 350 nm mostraron una mayor capacidad de discriminación del suero agudo con respecto al crónico y al negativo. En el caso de los CLP obtenidos a partir de los látex de tamaños de partícula mayores y menores, deberían optimizarse las condiciones experimentales de la reacción de IA para cada caso, antes de determinar el efecto real del tamaño de las partículas.

Cuando se evaluaron los CLP frente a un panel de 15 sueros negativos, 10 sueros agudos y 15 sueros crónicos, las 2 proteínas recombinantes fueron más reactivas frente

a los sueros agudos, indicando que estos Ag podrían ser marcadores útiles de Ac de fase aguda de Toxoplasmosis. En cambio, con el homogenato del parásito las distribuciones de la variación de A para los sueros agudos y crónicos fueron similares, evidenciándose su incapacidad para discriminar entre estos grupos. El panel de sueros empleado, con los sueros correctamente clasificados, en volumen suficiente y en condiciones para ser utilizados en los ensayos de IA, resultó difícil de obtener, lo que justifica el número limitado de sueros empleados

Respecto a la funcionalidad química de las partículas de látex, se observó que el rendimiento del CLP obtenido a partir de uno de los látex carboxilados resultó superior que el del CLP obtenido a partir de uno de los látex epoxidados. El menor rendimiento del látex epoxidado podría deberse a su menor densidad de carga y de grupos funcionales.

Como conclusión general se logró obtener partículas de látex sensibilizadas con antígenos del *T. gondii*, que fueron evaluadas en ensayos de IA frente a un reducido panel de sueros. Los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales ensayadas, indican que los mismos podrían resultar adecuados como reactivos de IA para detectar la fase aguda de la Toxoplasmosis.

Como trabajo a futuro, se deberían estudiar las condiciones óptimas para llevar a cabo los ensayos de IA para los distintos tamaños de partícula de los CLP considerados; y los resultados obtenidos en esta Tesis deberían ser validados frente a un panel de sueros más amplio.

ABREVIATURAS

A: Absorbancia

AA: Aminoácidos

Ac: Anticuerpo

AD: Aglutinación directa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AF: Adsorción física

Ag: Antígeno

Ag-Ac: Antígeno-anticuerpo

AIBN: 2,2'-azo-bis-isobutirilnitrilo

AUC: Área bajo la curva, del inglés: "Area Under the Curve"

BCA: Ácido bicinconínico.

BPO: Peróxido de benzoilo

BSA: Albúmina sérica bovina.

C: Conductividad

c.c.c.: Concentración crítica de coagulación.

CI: Complejos inmunes

CLP: Complejos látex-proteína.

CMC: Concentración micelar crítica.

DDI: Ultrapura destilada y deionizada

D_{DLS}: Diámetro promedio obtenido por dispersión de luz dinámica

DLS: Dispersión de luz dinámica, del inglés “Dynamic Light Scattering”

DO: Densidad óptica

DSM: Método de hinchazón dinámica de monómero, del inglés “Dynamic Monomer Swelling Method”

E: Especificidad

E1, E2, E3 y E4: Soluciones para la purificación en columna de Ni²⁺

EDC: N-N-(3-dimetilaminopropil) N'-etilcarbodiimida.

ELISA: Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas, del inglés “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

Em: Emulsificante

FI: Fuerza iónica

HAI: Hemoaglutinación indirecta

His: Histidina

IA: Inmunoaglutinación

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

Ig: Inmunoglobulina

IgA: Inmunoglobulina isotipo A

IgE: Inmunoglobulina isotipo E

IgG: Inmunoglobulina isotipo G

IgM: Inmunoglobulina isotipo M

IMAC: Cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado, del inglés “Immobilized-Metal Affinity Chromatography”

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

ISAGA: Prueba de inmunoabsorción y aglutinación, del inglés “Immunosorbent Agglutination Assay”

kDa: kiloDalton

LB: Caldo Luria-Bertani

MA-80: Dihexil sulfosuccinato de sodio

MAA: Ácido metacrílico

MDLS: Dispersión de luz dinámica a múltiples ángulos de medición.

ME: Microscopía electrónica.

mM: Milimolar

PBS: Buffer fosfato salino, del inglés “Phosphate-Buffered Saline”

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés “Polymerase Chain Reaction”

PEG: Polietilenglicol

pI: Punto isoeléctrico.

PLID: Distribución de intensidad de luz dispersada, del inglés “Particle Light Intensity Distribution

PM: Peso molecular

PS: Poliestireno.

PSD: Distribución de tamaños de partículas, del inglés “Particle Size Distribution”.

PVP: Poli(vinil pirrolidona)

ROC: del inglés “Receiver Operating Charecteristics”

S: Sensibilidad

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SF: Reacción de Sabin-Feldmann

St: Estireno.

T. gondii: Toxoplasma gondii

T: turbidimetría.

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina

TS: Tensión Superficial

UC: Unión covalente

NOMENCLATURA

C_{Hom}° : Concentración inicial de homogenato

C_{P35Ag}° : Concentración inicial de P35Ag

C_{P22Ag}° : Concentración inicial de P22Ag

D: Diámetro de partícula.

DO: Densidad óptica.

DO_{neg} : Densidad óptica obtenida frente al suero negativo.

DO_{ag} : Densidad óptica obtenida frente al suero agudo.

DO_{cr} : Densidad óptica obtenida frente al suero crónico.

$DO_{\text{ag}}/DO_{\text{neg}}$: Cociente entre la densidad óptica obtenida frente al suero agudo y la densidad óptica obtenida frente al suero negativo.

$DO_{\text{ag}}/DO_{\text{cr}}$: Cociente entre la densidad óptica obtenida frente al suero agudo y la densidad óptica obtenida frente al suero crónico.

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_0, 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_{Hom} : Cantidad de FRA unida por unidad de área de partículas.

Γ_{P22Ag} : Cantidad de P22Ag unida por unidad de área de partículas.

Γ_{P35Ag} : Cantidad de P35Ag unida por unidad de área de partículas.

$\Gamma_{Hom, cov}$: Cantidad de FRA unida por unidad de área de partículas, luego del proceso de desorción con Trirón X-100.

$\Gamma_{P22Ag, cov}$: Cantidad de P22Ag unida por unidad de área de partículas luego del proceso de desorción con Trirón X-100.

$\Gamma_{P35Ag, cov}$: Cantidad de P35Ag unida por unidad de área de partículas luego del proceso de desorción con Trirón X-100.

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.

$\delta_{C_2H_3O}$: Densidad de grupos C_2H_3O superficiales.

ρ : Densidad del polímero.

η : Viscosidad del medio.

ΔA : Incremento en la absorbancia óptica

$\Delta A/cut-off$: Distribución de la ΔA relativa.

$\Delta A_{ag}/\Delta A_{neg}$: cocientes entre la ΔA correspondiente al suero agudo y la ΔA para el suero negativo.

$\Delta A_{ag}/\Delta A_{cr}$: cocientes entre la ΔA correspondiente al suero agudo y la ΔA para el suero crónico.

μ_e : Movilidad electroforética.

ζ : Potencial Zeta.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A.; Lichtman, A. y Pober, J. (1997) *Cellular and molecular immunology* Philadelphia : Saunders, USA.

Ahmed, S.M.; El-Aasser, M.S.; Pauli, G.H.; Poehlein, G.W. y Vanderhoff, J.W. (1980) *Cleaning latexes for surface characterization by serum replacement* J. Colloid Interface Sci., 73: 388-405.

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J.D. (1996) *Molecular Biology of the Cell, 3° Ed.*, Garland Science, New York, U.S.A.

Amico, S.; Liehn, J.C.; Desoize, B.; Larbre, H.; Deltour, G. y Valeyre, J. (1991) *Comparison of phosphatase isoenzymes PAP and PSA with bone scan in patients with prostate carcinoma*. Clin. Nuci. Med. 16: 643-648.

Aubert, D.; Maine, G.; Villena, I.; Hunt, J.; Howard, L.; Sheu, M.; Brojanac, S.; Chovan, L.; Nowlan, S. y Pinon, J. (2000) *Recombinant antigens to detect Toxoplasma gondii-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay*. J. Clin. Microbiol. 38: 1144–1150.

Bahadur, A.; Bahadur, P. y Riess, G. (1985) *Immobilization of α -chymotrypsin on poly(methyl methacrylate-co-acrylic acid) core-shell latex* Makromol. Chem. 186: 1387-1394.

Bale, M.D.; Danielson, S.J.; Daiss, J.L.; Gopper, K.E y Sutton, R.C. (1989) *Influence of copolymer composition on protein adsorption and structural rearrangements at the polymer surface* J. Colloid Interf. Sci., 132: 176-187.

Basinska, T. y Slomkowski, S. (1993) *Polystyrene and Poly(Styrene/Acrolein) Latexes with Immobilized Proteins as a Basis of the Diagnostic Agglutination Test. En: Uses of Immobilized Biological Compounds* (Eds: Guilbaut, G.G. y Mascini, M.) NATO ASI Series, Springer, Netherlands. pp 453-462.

Bastos-González, D.; Ortega-Vinuesa, J.L.; De Las Nieves, F.J. e Hidalgo-Álvarez, R.J. (1995) *Carboxylated Latexes for Covalent Coupling Antibodies, I*. J. Colloid Interf. Sci., 176: 232-239.

Bastos-González, D.; Santos-Pérez, R.; Forcada, J.; Hidalgo-Álvarez, R. y De Las Nieves, F.J. (1994) *Surface and electrokinetic characterization of functional aldehyde polymer colloids*. Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp. 92: 137-146.

Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N. y Bourne, P. (2000) *The Protein Data Bank*. Nucleic. Acids Res. 28: 235-242.

Bird, G.W.G. y Wingham, J. (1977) *Agglutination and Agglutination-inhibition, in Techniques in Clinical Immunology*. (Ed Thompson R.A.) Blackwell Scientific, Oxford, U.K. p. 43-64.

Bloisi, R.M. (1988) *Principles of Immunology and Immunodiagnostic*. Ed. Lea/Tebiger,

Bolin, V.S.; Sue Chase, B. y Alsever, J.B. (1968) *A viral-latex agglutination test for detecting antibodies against isolates associated with viral hepatitis*. Am. J. Clin. Pathol., 49: 635-646.

Borque, L.; Bellod, L.; Rus, A.; Seco, M.L. y Galisteo-González, F. (2000) *Development and Validation of an Automated and Ultrasensitive Immunoturbidimetric Assay for C-Reactive Protein*. Clin. Chem., 46: 1839-1842.

Bucsi, A.; Forcada, J.; Gibanel, S.; Héroguez, V.; Fontanille, M. y Gnanou Y. (1998) *Monodisperse Polystyrene Latex Particles Functionalized by the Macromonomer Technique*. Macromolecules. 31: 2087-2097.

Bullock, G.R. y Petrusz, P. (1989) *Techniques in immuno-cytochemistry. Vol. 4*. Academic Press, Ney York, U.S.A.

Cambiaso, C.L.; Galanti, L.C.; Leautaud, P. y Masson, P.L. (1992) *Latex agglutination assay of human immunoglobulin M antitoxoplasma antibodies which uses enzymatically treated antigen-coated particles*. J. Clin. Microbiol. 30: 882-888.

Carral, L.; Kaufer, F.; Durlach, R.; Freuler, C.; Olejnik, P.; Nadal, M.; Corazza, R.; Pari, M.; Garcia, L.; Cordoba, S.; Rodriguez, M; Ceriotto, M. y García, G. (2008).

Estudio multicéntrico para la prevención de la toxoplasmosis prenatal en Buenos Aires. Medicina, 68: 417-422.

Carson, J.L.; Eisenberg, J.M.; Shaw, L.M.; Kundel, H.L. y Soper, K.A. (1985) *Diagnostic accuracy of four assays of prostatic acid phosphatase. Comparison using receiver operating characteristic curve analysis. JAMA* 253: 665-669.

Charleux, B.; Fanget, P. y Pichot, C. (1992) *Radical-initiated copolymers of styrene and p-formylstyrene, 2. Preparation and characterization of emulsifier-free copolymer latices. Makromol. Chem.*, 193: 205-220.

Chen, C. y Lee, W. (1999) *Preparation of Methyl Methacrylate and Glycidyl Methacrylate Copolymerized Nonporous Particles. J. Polym. Sci: A: Polym. Chem.* 37: 1457-1463.

Chen, J.; Jin, M.; Yu, Z.; Dan, H.; Zhang, A.; Song, Y. y Chen, H. (2007) *A latex agglutination test for the rapid detection of avian influenza virus subtype H5N1 and its clinical application. J. Vet. Diagn. Invest.*, 19: 155-160.

Chen, X.; Hiller, M.; Sancak, Y. y Fuller, M.T. (2005) *Tissue-specific TAFs counteract Polycomb to turn on terminal differentiation. Science*, 310: 869-872.

Chong, C.; Jeong, W.; Kim, H.; An, D.; Jeoung, H.; Ryu, J.; Ko, A.; Kim, Y.; Hong, S.; Yang, Z. y Nam, H. (2011) *Development and clinical evaluation of a rapid serodiagnostic test for toxoplasmosis of cats using recombinant SAG1 antigen. Korean J. Parasitol.* 49: 207-212.

Clemente, M.; Curilovic, R.; Sassone, A.; Zelada, A.; Angel S. y Mentaberry A. (2005) *Production of the main surface antigen of Toxoplasma gondii in tobacco leaves and analysis of its antigenicity and immunogenicity. Mol. Biotechnol.* 30: 41-50.

Clementi, L.A. (2012) *Caracterización de Partículas Nanométricas por Técnicas de Dispersión de Luz. Estimación de Distribuciones de Tamaños en Látex Poliméricos. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Litoral, Argentina.*

Cóceres, V.; Laguia Becher, M.; De Napoli, M.; Corvi, M.; Clemente, M. y Angel, S. (2010) *Evaluation of the antigenic value of recombinant Toxoplasma gondii HSP20 to detect specific immunoglobulin G antibodies in Toxoplasma infected humans. Exp. Parasitol.* 126: 263-266.

Cohen, R.J. y Benedek, G.B. (1975) *Immunoassay by Light-Scattering Spectroscopy* Immunochem. 12: 349-351.

Costa, J.G. (2014) *Estudio de la utilidad de las proteínas P22, P30 y P35 de Toxoplasma gondii para el diagnóstico de fase aguda de la toxoplasmosis*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

Daniels, W.E.; Vanderhoff, J.W.; Enos, C.T.; Iacoviello, J.G.; Ahmed, S.M. y Frost, J. (1981) *Emulsion Polymerization of Vinyl Acetate*. (Eds.: El-Aasser, M.S. y Vanderhoff, J.W), Applied Science Publishers, London, U.K. p. 191-202.

De Meuter, F. y De Decker, H. (1975) *Indirect fluorescent antibody test in toxoplasmosis. Advantage of the use of fluorescent anti-IgG conjugate*. Zentralbl Bakteriologie 233: 421-430.

De Wit, R.; Hoek, F.J.; Bakker, P.J. y Veenhof, C.H. (1991) *The value of MCA, CA 15-3, CEA and CA-125 for discrimination between metastatic breast cancer and adenocarcinoma of other primary sites*. J. Intern. Med. 229: 463-466.

Delair, T.; Marguet, V.; Pichot C. y Mandrand B. (1994) *Synthesis and Characterization of Cationic Amino Functionalized Polystyrene Latexes* Colloid Polym. Sci., 272: 962-970.

Derouin, F. y Thullize, P. (1994) *Diagnostic biologique de la toxoplasmose*. Laborama, 33: 2-27.

Desmonts, G.; Baufine-Ducrocq, H.; Couzineau, P. y Peloux, Y. (1974) *Natural antibodies against Toxoplasma*. Nouv Presse Med. 15: 1547-1549.

Dey, S.; Madhan Mohan, C.; Ramadass, P. y Nachimuthu, K. (2007) *Recombinant antigen-based latex agglutination test for rapid serodiagnosis of leptospirosis*. Vet Res Commun. 31: 9-15.

Dorman, L. y Mani, I. (1980) *Method of coupling a protein to an epoxylated latex*. US Patent 4,210,723.

Dupont, A.; Cusan, L.; Gómez, J.L.; Thibeault, M.M.; Tremblay, M. y Labrie, F. (1991) *Prostate specific antigen and prostatic acid phosphatase for monitoring therapy of carcinoma of the prostate*. J. Urol. 146: 1064-1068.

Durlach, R.; Kaufer, F.; Carral, L.; Freuler, C.; Ceriotto, M.; Rodriguez, M.; Freilij, H.; Altcheh, J.; Vazquez, L.; Corazza, R.; Dalla Fontana, M.; Arienti, H.; Sturba, E.; Gonzalez Ayala, S.; Cecchini, E.; Salomon, C.; Nadal, M.; Gutierrez, N. y Guarnera, E. (2008) *Consenso Argentino de Toxoplasmosis Congénita*. MEDICINA. 68:75-87.

El-Aasser, M.S.; Ahmed, S.M.; Poehlein, G.W.; Vanderhoff, J.W.; Rovira, X.; Taberner, J.I. y de La Morena, P. (1980) *Application of the Serum Replacement Technique in the Characterization of an Ethyl Acrylate-Methyl Methacrylate Copolymer Latex* Polym. Colloids II, 361-377.

Elwing, H.; Nilsson, B.; Svensson, K.E.; Askendahl, A.; Nilsson U.R. y Lundstrom J. (1988) *Conformational changes of a model protein (complement factor 3) adsorbed on hydrophilic and hydrophobic solid surfaces*. J. Colloid Interf. Sci., 125: 139-145.

Elwing, H.; Nilsson, B.; Svensson, K.E.; Askendahl, A.; Nilsson U.R. y Lundstrom J. (1988) *Conformational changes of a model protein (complement factor 3) adsorbed on hydrophilic and hydrophobic solid surfaces*. J. Colloid Interf. Sci., 125: 139-145.

Engvall, E. y Perlmann, P. (1972) *Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes*. J. Immunol., 109: 129-135. (1972).

Ferreira, A.W. y Camargo, ME. (2002) *Toxoplasmosis and the laboratory: Diagnosis and a constant striving for improvement*. Rev Inst Med Trop S Paulo. 44: 119-120.

Flack, M.R.; Oldfield, E.H.; Cutler, G.B.; Zweig, M.H.; Malley, J.D.; Chrousos, G.P. (1992) *Urine free cortisol in the high-dose dexamethasone suppression test for the differential diagnosis of the Cushing syndrome*. Ann. Intern. Med. 116: 211-217.

Forcada J. e Hidalgo-Álvarez, R. (2005) *Functionalized Polymer Colloids: Synthesis and Colloidal Stability* Curr. Org. Chem., 9: 1067-1084.

Frenkel, J.K. (1990) *Toxoplasmosis in human beings*. JAMA, 196: 240-248.

Ganachaud, F.; Mouterde, G.; Delair, T.; Elaïssari, A. y Pichot, C. (1995) *Preparation and characterization of cationic polystyrene latex particles of different aminated surface charges*. Polym. Adv. Tech., 6: 480-488.

Garcia, V.S. (2011) *Obtención de un Reactivo de Inmunoaglutinación para el Diagnóstico de la Infección por Trypanosoma Cruzi*, Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

Garcia, V.S.; Gonzalez, V.D.G.; Caudana, P.C.; Vega, J.R.; Marcipar, I.S y Gugliotta, L.M. (2013) *Synthesis of latex-antigen complexes from single and multiepitope recombinant proteins. Application in immunoagglutination assays for the diagnosis of Trypanosoma cruzi infection*. Colloids Surf B Biointerfaces 101: 384–391.

Garcia, V.S.; Gonzalez, V.D.G.; Marcipar, I.S.; Vega, J.R. y Gugliotta, L.M. (2014) *Optimisation and standardisation of an immunoagglutination assay for the diagnosis of Trypanosoma cruzi infection based on latex-(recombinant antigen) complexes*. Trop Med Int Health 19: 37–46.

Gasteiger, E.; Gattiker, A.; Hoogland, C.; Ivanyi, I.; Appel, R.D. y Bairoch, A. (2003) *ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis*. Nucl. Acids Res. 31:3784-3788.

Gibanel, S.; Heroguez, V.; Gnanou, Y.; Aramendia, E.; Bucsi, A. y Forcada, J. (2001) *Monodispersed polystyrene latex particles functionalized by the macromonomer technique. II. Application in immunodiagnosis*. J. Polym. Adv. Technol. 12: 494-499.

Golchin, M.; Khalili-Yazdi, A.; Karamouzian, M. y Abareghi, A. (2012). *Latex Agglutination Test Based on Single-Chain Fv Recombinant Antibody Fragment*. Scand. J. Immunol. 75: 38-45.

Gong, Z.; Wan, H.; Tay, T.L.; Wang, H.; Chen, M. y Yan, T. (2003) *Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 308: 58-63.

González Cappa, S.M (2012) *Núcleo Socio Productivo Estratégico Enfermedades Infecciosas. Documento de Referencia*. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Presidencia de la Nación, Argentina. Disponible en: http://www.argentinainnovadora2020.mincyt.gob.ar/?wpfb_dl=45

Gonzalez, V.D.G. (2004) *Síntesis y Caracterización de un Látex Monodisperso Carboxilado y Sensibilizado para Detectar la Enfermedad de Chagas*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

Gonzalez, V.D.G.; Garcia, V.S.; Vega, J.R.; Marcipar, I.S.; Meira, G.R. y Gugliotta, L.M. (2010) *Immunodiagnosis of Chagas disease: Synthesis of three latex-protein complexes containing different antigens of Trypanosoma cruzi*. Colloids Surf B Biointerfaces 77:12-17.

Gonzalez, V.D.G.; Gugliotta, L.M. Giacomelli, C.E. y Meira, G.R. (2008b) *Latex of immunodiagnosis for detecting the Chagas disease: II. Chemical coupling of antigen Ag36 onto carboxylated latexes*. J. Mater. Sci. Med. 19:789-195.

Gonzalez, V.D.G.; Gugliotta, L.M. y Meira, G.R. (2008a) *Latex of immunodiagnosis for detecting the Chagas disease. I. Synthesis of the base carboxylated latex*. J. Mater. Sci. Med. 19:777-788.

Gonzalez, V.D.G.; Gugliotta, L.M.; Vega, J.R. y Meira, G.R. (2005) *Contamination by Larger Particles of Two Almost-Uniform Latexes: Analysis by Combined Dynamic Light Scattering and Turbidimetry*. J. Colloid Interface Sci. 285: 581-589.

Goossens, J. W. S. y Zembrod, A. (1979) *Characterisation of the surface of polymer latices by photon correlation spectroscopy* Colloid Polym. Sci. 257: 437-438.

Gugliotta, L.M. y Vega, J.R. (2010) *Measurement of Particle Size Distribution of Polymer Latexes*. Research Signpost, Kerala, India.

Gugliotta, L.M., Clementi, L.A. y Vega, J.R. (2010) *Particle Size Distribution. Main Definitions and Measurement Techniques*. En: *Measurement of Particle Size Distribution of Polymer Latexes* (Eds.: Gugliotta, L.M. y Vega, J.R.) Research Signpost, Kerala, India. pp. 1-58.

Gugliotta, L.M.; Vega, J.R. y Meira, G.R. (2000) *Latex Particle Size Distribution by Dynamic Light Scattering: Computer Evaluation of Two Alternative Calculation Paths*. J. Colloid Interface Sci. 228: 14-17.

Guyatt, G.H.; Oxman, A.D.; Alí, M.; Willan, A.; McIlroy, W. y Patterson, C. (1992) *Laboratory diagnosis of iron-deficiency anemia: an overview*. J. Gen. Intern. Med. 7: 145-153.

Hammock, B.D. y Mumma, R.O. (1980) *Potential of immunochemical technology for pesticide analysis*. En *Advances in Pesticide Analytical Methodology*, (Eds.: Harver,

J. y Zweig, G.) American Chemical Society Symposium Series, ACS Publications, Washington, D.C., U.S.A., p 321-352.

Harkins, W.D., (1946) *A General Theory of the Reaction Loci in Emulsion Polymerization. II* J. Chem. Phys. 14: 47-48.

Harlow, E. y Land, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U.S.A.

Haro-Pérez, C.; Quesada-Pérez, M.; Callejas-Fernández, J.; Sabaté, R.; Estelrich, J. y Hidalgo-Álvarez, R. (2005) *Probing the jellium model with colloidal dispersions of charged liposomes*. Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Aspects 270–271: 352–356.

Hen, J. (1974) *Determination of surface carboxyl groups in styrene/itaconic acid copolymer latexes*. J. Colloid Interface Sci., 49: 425-432.

Hermann, G.A.; Sugiura, H.T. y Krumm, R.P. (1986) *Comparison of thyrotropin assays by relative operating characteristic analysis*. Arch. Pathol. Lab. Med. 110: 21-25.

Heymer, B.; Schachenmayr, W.; Bultmann, B.; Spanel, A.; Haferkamp, O. y Schmidt, W. (1973) *A latex agglutination test for measuring antibodies to Streptococcal mucopeptides*. J. Immunol., 111: 478-484.

Hidalgo-Álvarez R. y Galisteo-González F. (1995) *The adsorption characteristics of immunoglobulins*. Heterog. Chem. Rev. 2: 249-268.

Hipp, S.; Berns, D.S.; Tompkins, V. y Buckley, H. (1970) *Latex slide agglutination test for Aspergillus antibodies*. Sebouraudia, 8: 237-241.

Hiszczyńska-Sawicka, E.; Kur, J.; Pietkiewicz, H.; Holec, L.; Gasior, A. y Myjak, P. (2005) *Efficient production of the Toxoplasma gondii GRA6, p35 and SAG2 recombinant antigens and their applications in the serodiagnosis of toxoplasmosis*. Acta Parasitol. 50: 249–254.

Hong, J.; Hong, C.K. y Shima, S.E. (2007) *Synthesis of polystyrene microspheres by dispersion polymerization using poly(vinyl alcohol) as a steric stabilizer in aqueous alcohol media*. Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp. 302: 225–233.

Horwitz, C.; Jerome, E.; Diamond, R. y Ward, P. (1973) *Evaluation of a latex tube agglutination-inhibition pregnancy test. An analysis of 1,776 specimens.* Am. J. Obstet. Gynecol., 116: 626-632.

Hou, X.; Liu, B.; Deng, X.; Zhang, B. y Yan, J. (2007) *Monodisperse polystyrene microspheres by dispersion copolymerization of styrene and other vinyl comonomers: Characterization and protein adsorption properties.* J. Biomed. Mater. Res. A. 83: 280-289.

Izquierdo Rojo, M. (2001) *Ingeniería Genética y Transferencia Génica.* Ediciones Pirámide, Madrid, España.

Jalallou, N.; Bandepour, M.; Khazan, H.; Haghghi, A.; Abdollahi, S.H. y Kazemi, B. (2010) *Recombinant SAG1 antigen to detect Toxoplasma gondii specific immunoglobulin G in human sera by ELISA test.* Iranian J. Parasitol. 5: 1-9.

Jenum, P.A.; Stray-Pedersen, B. y Gundersen, A.G. (1997) *Improved diagnosis of primary Toxoplasma gondii infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity.* J Clin Microbiol. 35: 1972-1977.

Jiang, T.; Gong, D.; Ma, L.; Nie, H.; Zhou, Y.; Yao, B. y Zhao, J. (2008) *Evaluation of a recombinant MIC3 based latex agglutination test for the rapid serodiagnosis of Toxoplasma gondii infection in swines.* Vet. Parasitol. 158: 51-56.

Johnstone, A. y Thorpe, R. (1982) *Immunochemistry in Practice. 1st Ed.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K.

Kadar, N.; DeCherney, A.H. y Romero, R. (1982) *Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis of the relative efficacy of single and serial chorionic gonadotropin determinations in the early diagnosis of ectopic pregnancy.* Fertil. Steril. 37: 542-547.

Kamiyama, M.; Koyama, K.; Matsuda, H. y Sano, Y. (1993) *Micron-sized polymeric microsphere by suspension polymerization.* J. Appl. Polym. Sci. 50: 107-113.

Kapmeyer, W.H. (1991) *Nephelometric immunoassay with shell/core particles.* Pure Appl. Chem., 63: 1135-1139.

Kapmeyer, W.H.; Pauly, H.E. y Tuengler, P. (1988) *Automated nephelometric immunoassays with novel shell/core particles.* J. Clin. Lab. Anal., 2: 76-83.

Kawaguchi, H. (2000) *Functional polymer microspheres*. Prog. Polym. Sci. 25: 1171–1210.

Kawaguchi, S. e Ito, K. (2005) *Dispersion Polymerization*. Adv. Polym. Sci. 175: 299–328.

Kazmierczack, S.C.; Catrou, P.G. y Van Lente, F. (1993) *Diagnostic accuracy of pancreatic enzymes evaluated by the use of multivariate data analysis*. Clin. Chem. 39: 1960-1965.

Kazmierczack, S.C.; Van Leute, F. y Hodges, E.D. (1991) *Diagnostic and prognostic utility of phospholipase A activity in patients with acute pancreatitis: comparison with amylase and lipase*. Clin. Chem. 37: 356-360.

Kim, I.; Pollit, E. y Leibel, R.L. (1984) *Application of receiver-operator analysis to diagnostic tests of iron deficiency in man*. Pediatr. Res. 18: 916-920.

Kimbita, E.; Xuan, X.; Huang, X.; Miyazawa, T.; Fukumoto, S.; Mishima, M.; Suzuki, H.; Sugimoto, C.; Nagasawa, H.; Fujisaki, K.; Suzuki, N.; Mikami, T. y Igarashi, I. (2001) *Serodiagnosis of Toxoplasma gondii infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1*. Vet. Parasitol. 102: 35–44.

Kitano, H.; Iwai, S.; Okubo, T. y Ise, N. (1987) *Direct examination of chemical kinetic laws by visual imagery. 3. Association of latex particles modified with antigens and antibodies*. J. Am. Chem. Soc. 109:7608-7612.

Kling J.A. y Ploehn H.J. (1995) *Synthesis and characterization of epoxy-functional polystyrene particles* J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem., 33: 1107-1118.

Koppel, D.E. (1972) *Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants* J. Chem. Phys. 57, 4814-4820.

Kourti, T. (1989) *Polymer Latexes Production by Homogeneous Nucleation and Methods for Particle Size Determination*, PhD Thesis, McMaster University, Canada.

Kwok, S. e Higuchi, R. (1989) *Avoiding false positives with PCR*. Nature, 339: 237-238.

La Vaille, E. A. Di Blasio, S. Kovacic, K. L. Grant, P. F. Schendel, J. M. McCoy. (1993) *A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm*. Biotechnology, 11: 187-198.

Labib, M.E. y Robertson, A.A. (1980) *The conductometric titration of lattices*. J. Colloid Interface Sci. 77: 151-161.

Laemmli, U.K. (1970) *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4* Nature, 227: 680-685.

Langone, J.J. y Van Vunakis, H. (1975) *Radioimmunoassay for dieldrin and aldrin*. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 10: 163-171.

Lappalainen, M. y Hedman, K. (2004) *Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity*. Ann Ist Super Sanità. 40: 81-88.

Lauritzen, E.; Tuchsén, P.; Hansen, E. y Skovgaard, O. (1991) *BPTI and N-terminal extended analogues generated by factor Xa cleavage and cathepsin C trimming of a fusion protein expressed in Escherichia coli*. Prot. Expr. Purif., 2: 372-378.

Lefkowitz, I. y Pernis, P. (1997) *Immunological Methods*. Academic Press, New York, U.S.A.

Leroux, M.L.; Rabson, J. y Desjardins, P.R.E. (1984) *Clinical effectiveness of the Du Pont assay measurement of creatine kinase MB in serum from patients in a coronary-care unit*. Clin. Chem. 30: 1552-1554.

Leung, F.Y.; Galbraith, L.V.; Jablonsky, G. y Henderson, A.R. (1989) *Reevaluation of the diagnostic utility of serum total creatine kinase and creatine kinase-2 in myocardial infarction*. Clin. Chem. 35: 1435-1440.

Li, S.; Maine, G.; Suzuki, Y.; Araujo, F.; Galvan, G.; Remington, J. y Parmley, S. (2000) *Serodiagnosis of recently acquired Toxoplasma gondii infection with a recombinant antigen*. J. Clin. Microbiol. 38: 179-184.

Litchfield, W.J.; Craig, A.R.; Frey, W.A.; Leflar, C.C.; Looney, C.E. y Luddy, M.A. (1984) *Novel shell/core particles for automated turbidimetric immunoassays*. Clin. Chem., 30: 1489-1493.

Lloset, M.A.; Gugliotta, L.M. y Meira, G.R. (1996) *Particle Size Distribution of SBR and NBR Latexes by UV-Vis Turbidimetry Near the Rayleigh Region*. Rubber Chem. & Tech., 69: 696-712 (1996).

Lott, J.A. y Lu, C.J. (1991) *Lipase isoforms and amylase isoenzymes: assays and application in the diagnosis of acute pancreatitis*. Clin. Chem. 37: 361-368.

Lucas, L. J.; Han, J. y Yoon, J. (2006) *Using highly carboxylated microspheres to simplify immunoassays and enhance diffusional mixing in a microfluidic device*. Colloids surf, B Biointerfaces, 49: 106-111.

Maehara, T.; Eda, Y.; Mitani, K. y Matsuzawa, S. (1987) *Glycidyl methacrylate-styrene copolymer latex particles for immunologic agglutination tests*. Biomaterials, 11: 122-126.

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. y Gagliardi Leire, J.P. (2007) *Development of a rapid and sensitive latex agglutination-based method for detection of group A rotavirus* J. Virol. Methods, 148:211-217.

Marchand, A.; Van Lente, F.; Galen, R.S. (1983) *The assessment of laboratory tests in the diagnosis of acute appendicitis*. Am. J. Clin. Pathol. 80: 369-374.

Martin, V.; Supanitsky, A.; Echeverria, P.; Litwin, S.; Tanos, T.; De Roodt, A.; Guarnera, E. y Angel, S. (2004) *Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the gra4 gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11: 704-710.

Mateo, C.; Abian, O.; Fernández-Lorente, G.; Pedroche, J.; Fernández-Lafuente, R.; Guisan, J.M.; Tam, A. y Daminati, A. (2002) *Epoxy Sepabeads: A novel Epoxy Support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment*. Biotechnol. Prog. 18: 629-634.

Mateo, C.; Torres, R.; Fernández-Lorente, G.; Ortiz, C.; Fuentes, M.; Hidalgo, A.; López-Gallego, F.; Abian, O.; Palomo, J.M.; Betancor, L.; Pessela, B.C.; Guisan, J.M. y Fernández-Lafuente, R. (2003) *Epoxy-Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method*. Biomacromolecules 4: 772-777.

Medina, M.B.; Shelver, W.L.; Fratamico, P.M.; Fortis, L.; Tillman, G.; Narang, N. y DebRoy, A. (2012). *Latex agglutination assays for detection of non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145*. J Food Prot. 75: 819-826.

Metz C.E. (1978) *Basic principles of ROC analysis*. Sem. Nucl. Med. 8: 283-298.

- Metz, C.E. (1986) *ROC methodology in radiologic imaging*. Invest. Radiol. 21: 720-733.
- Miraballes-Martínez, I. y Forcada, J. (2000) *Synthesis of latex particles with surface amino groups*. J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem., 38: 4230-4237.
- Miraballes-Martínez, I.; Martín-Molina, A.; Galisteo-González, F. y Forcada, J. (2001) *Synthesis of amino-functionalized latex particles by a multistep method*. J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem., 39: 2929-2936.
- Miraballes-Martínez, I.; Martín-Rodríguez, A. e Hidalgo-Álvarez, R., (1997) *Chloroactivated latex particles for covalent coupling of antibodies. Application to immunoassays*. J. Biomater. Sci. Polymer Ed., 8: 765-777.
- Miranda, J.M.; Mondragón, A.C.; Martínez, B.; Guarddon, M. y Rodríguez, J.A. (2009) *Prevalence and antimicrobial resistance patterns of Salmonella from different raw foods in Mexico*. J. Food Prot. 5 :966-971.
- Molina-Bolívar, J.A. (1999) *Mecanismos de estabilidad coloidal. Teoría y Aplicación a Inmunoensayos*. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, España.
- Molina-Bolívar, J.A. y Galisteo-González, F. (2005) *Latex Immunoagglutination Assays*. J. Macromol. Sci. Part C: Polymer Reviews, **45**:59-98.
- Molina-Bolivar, J.A. y Ortega-Vinuesa, J.L. (1999) *How proteins stabilize colloidal particles by means of hydration forces*. Langmuir, 15: 2644-2653.
- Molina-Bolivar, J.A., Galisteo-González, F. y Hidalgo-Álvarez, R. (1998) *Latex immunoassays: comparative studies on covalent and physical immobilization of antibodies. I. F(ab')₂ fragments*. J. Biomater Sci. Polymer Ed., 9: 1089-1101.
- Montagne, P.; Laroche, P.; Cuilliere, M.L.; Varcin, P.; Pau, B. y Duheille, J. (1992) *Microparticle-enhanced nephelometric immunoassay for human C-reactive protein*. J. Clin. Lab. Anal., 6: 24-29.
- Montoya, M.T.; Gómez, J.E.; Castaño, J.C.; Marx, C.; Aubert, D.; Bonhomme, A. y Pinon, J.M. (1996) *Avances diagnósticos en toxoplasmosis. PCR, nuevos marcadores de infección evolutiva y otras técnicas* Acta Med. Colomb. 21:127-138.
- Moraveji, M.; Hosseini, A.; Moghaddara, N.; Namavari, M.M. y Eskandari, M.H. (2012) *Development of latex agglutination test with recombinant NcSAG1 for the*

rapid detection of antibodies to Neospora caninum in cattle. Vet. Parasitol. 189: 211-217.

Muñiz Hernández, S. y Mondragón Flores, R. (2009) *Toxoplasma Gondii, un Patógeno Asesino Re-Emergente*. REB 28: 52-58.

Napper, D.H. (1983) *Polymeric Stabilization of Colloidal Dispersions*. (Eds.: Ottewill, R.H. y Rowell, R.L.) Academic Press, London, U.K. p. 8-30.

Nigro, M.; Gutierrez, A.; Hoffer, A.; Clemente, M.; Kaufer, F.; Carral, L.; Martina, V.; Guarnera, E. y Angel, S. (2003) *Evaluation of Toxoplasma gondii recombinant proteins for the diagnosis of recently acquired toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 47: 609–613.

Nilsson, B.; Fosberg, G.; Moks, T.; Hartmanis, M. y Uhlém, M. (1992) *Fusion proteins in biotechnology and structural biology* Curr. Opin. Struct. Biol., 2: 569-575.

Norde, W. (1995) *Adsorption of proteins at solid-liquid interfaces*. Cells Materials 5: 97-112.

Norde, W. y Giacomelli, C. (1999) *Conformational changes in proteins at interfaces: from solution to the interface, and back*. Macromol. Symp. 145: 125-136.

Okubo, M.; Kamei, S.; Tosaki, Y.; Fukunaga, K. y Matsumoto, T. (1987) *Covalent immobilization of trypsin onto poly(2-hydroxyethyl methacrylate)/polystyrene composite microspheres by cyanogen bromide method and its enzymatic activity*. Colloid Polym. Sci., 265:957-964.

Okubo, M.; Shiozaki, M.; Tsujihiro, M. y Tsukada, Y. (1991) *Preparation of micron-size monodisperse polymer particles by seeded polymerization utilizing the dynamic monomer swelling method*. Coll. Polym. Sci. 269: 222-226.

Okumura, T.; Nagai, F.; Yamamoto, S.; Hashimoto, T.; Ito, M. y Sawada, H., (2008) *Development of the reverse passive latex agglutination method for the detection and quantification of the genus Nitrospira in the wastewater treatment process*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 72: 360-367.

Okumura, T.; Nagai, F.; Yamamoto, S.; Yamano, K.; Oseko, N.; Inouye, K.; Oomura, H. y Sawada, H. (2004) *Detection of white spot syndrome virus from stomach tissue homogenate of the kuruma shrimp (Penaeus japonicus) by reverse passive latex agglutination*. J. Virol. Methods, 119: 11-16.

Omi, S.; Katami, K.; Yamamoto, A. e Iso, M. (1994) *Synthesis of polymeric microspheres employing SPG emulsification technique*. J. Appl. Polym. Sci. 51: 1-11.

Ortega-Vinuesa, J.L. e Hidalgo-Álvarez, R. (1993) *Study of the adsorption of $F(ab')_2$ onto polystyrene latex beads*. Colloids Surf B Biointerfaces, 1: 365-372.

Ortega-Vinuesa, J.L.; Molina-Bolívar, J.A.; Peula, J.M. e Hidalgo-Álvarez, R. (1997) *A comparative study of optical techniques applied to particle-enhanced assays of C-reactive protein*. J. Immunol. Methods, 205: 151-156.

Ortega-Vinuesa, L.J.; Gálvez Ruiz, M.J. e Hidalgo-Álvarez, R. (1996) *$F(ab')_2$ -Coated Polymer Carriers: Electrokinetic Behavior and Colloidal Stability*. Langmuir 12: 3211-3220.

Ortega-Vinuesa, L.J.; Molina-Bolívar, J.A. e Hidalgo-Álvarez, R., (1996) *Particle enhanced immunoaggregation of $F(ab')_2$ molecules*. J. Immunol. Methods, 190: 29-38.

Ortega-Vinuesa, L.J. y Bastos-González, D. (2000) *A review of factors affecting the performances of latex agglutination tests*. J. Biomater. Sci. Polymer Edn, 12: 379-408.

Parmley, S.F.; Sgarlato, G.D.; Mark, J.; Prince, J.B. y Remington, J.S. (1992) *Expression, characterization, and serologic reactivity of recombinant surface antigen P22 of *Toxoplasma gondii**. J. Clin. Microbiol. 30: 1127-1133.

Peula, J.M.; Hidalgo-Álvarez, R.; Santos, R.; Forcada, J. y De Las Nieves, F.J. (1995) *Covalent coupling of antibodies to aldehyde groups on polymer carriers*. J. Materials Sci.: Materials in Medicine, 6: 779-785.

Peula, J.M.; Puig, J.; Serra, J.; de las Nieves, F.J. e Hidalgo-Alvarez, R. (1994) *Electrokinetic characterization and colloidal stability of polystyrene latex particles partially covered by IgG/a-CRP and m-BSA proteins*. Colloids Surface A: Physicochem Eng. Aspects. 92:127-136.

Peula, J.M.; Santos, R.; Forcada, J.; Hidalgo-Alvarez, R. y de las Nieves, F.J. (1998) *Study on the Colloidal Stability Mechanisms of Acetal-Functionalized Latexes*. Langmuir 14: 6377-6384.

Peula-García, J.M.; Molina-Bolivar, J.; Velasco, A.; Rojas, F. y Galisteo-González, (2002) *Interaction of Bacterial Endotoxine (Lipopolysaccharide) with Latex Particles: Application to Latex Agglutination Immunoassays*. J. Colloid Interf. Sci., 245: 230-236.

Pichot, C. (2004) *Surface-functionalized latexes for biotechnological applications*. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 9: 213–221.

Pichot, C. y Delair, T. (2005) Specialty Applications of Latex Polymers. En: Chemistry and Technology of Emulsion Polymerisation (Ed.: van Herk, A.) Blackwell Publishing Ltd, Oxford, Reino Unido, pp. 257-278.

Pichot, C., Delair, T. y Elaïssari, A. (1997) *Polymer colloids for biomedical and pharmaceutical applications*. En: *Polymeric Dispersions: Principles and Applications*.(Ed.: Asua J.M.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos pp. 515-529.

Pietkiewicz, H.; Hiszczyńska-Sawicka, E.; Kur, J.; Petersen, E.; Nielsen, H.V.; Stankiewicz, M.; Andrzejewska, I. y Myjak, P. (2004) *Usefulness of Toxoplasma gondii-specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis*. J. Clin. Microbiol. 42: 1779–1781.

Polpanich, D.; Tangboriboonrat, P.; Elaïssari, A. y Udomsangpetch, R., (2007) *Detection of malaria infection via latex agglutination assay*. Anal. Chem, 79: 4690-4695.

Porath, J.; Garlsson, J.; Olsson, I. y Belfrage, G. (1975) *Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation*. Nature, 258: 598-599.

Press, C.; Montoya, J.G. y Remington, J.S. (2005) *Use of a single serum sample for diagnosis of acute toxoplasmosis in pregnant women and other adults*. J. Clin. Microbiol., 43: 3481-3483.

Quast, G.; Roch, A.M.; Niveleau, A.; Grange, J.; Keolouangkhot, T. y Huppert, J. (1978) *The preparation of latex particles with covalently bound polyamines, IgG and measles agglutinins and their use in visual agglutination tests*. J. Immunol. Methods, 22: 165-174.

Quesada, M.; Puig, J.; Delgado, J.M.; Peula, J.M.; Molina, J.A. e Hidalgo-Álvarez, R. (1996) *A simple kinetic model of antigen-antibody reactions in particle-enhanced light scattering immunoassays*. Colloids and Surface B: Biointerfaces, 8: 303-309.

Ramos, J.; Martín-Molina, A.; Sanz-Izquierdo, M.P.; Rus, A.; Borque, L.; Hidalgo-Álvarez, R.; Galisteo-González, F. y Forcada, J. (2003) *Amino-functionalized*

latex particles obtained by a multistep method: Development of a new immunoreagent. J. Polym. Sci., A, Polym. Chem, 41:2404-2411.

Redlich, A. y Muller, W.A. (1998) *Serodiagnosis of acute toxoplasmosis using a recombinant form of the dense granule antigen GRA6 in an enzyme-linked immunosorbent assay.* Parasitol. Res. 84: 700-706.

Reiter-Owona, I.; Petersen, E. y Joynson, D. (1999) *The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis.* Bull World Health Organ. 77: 929-935.

Ricker, D.M.; Hebert, L.A.; Rohde, R.; Sedmak, D.D.; Lewis, E.J. y Clough, J.D. (1991) *Serum C3 levels are diagnostically more sensitive and specific for systemic lupus erythematosus activity than are serum C4 levels.* Am. J. Kidney Dis. 18: 678-685.

Robertson, E.A. y Zweig, M.H. (1981) *Use of Receiver Operating Characteristic Curves to evaluate the clinical performance of analytical systems.* Clin. Chem., 27: 1569-1574.

Rüchel, R.; Steere, R.L. y Erbe, E.F. (1978) *Transmission-electron microscopic observations of freeze-etched polyacrylamide gels* J. Chromatogr., 166: 563-575.

Ryan, E.D. y Bilous, G. (1983) *Serum 5'-nucleotidase: Automation of a manual assay and brief observations on values in patients with breast cancer.* Clin. Biochem. 16: 249-253.

Sabin, A.B. y Feldman, H.A. (1949) *Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (Toxoplasma)* Science. 108: 660-663.

Sager, H.; Gloor, M.; Tenter, A.; Maley, S.; Hassig, M. y Gottstein, B. (2003) *Immunodiagnosis of primary Toxoplasma gondii infection in sheep by the use of a P30 IgG avidity ELISA.* Parasitol. Res. 91: 171-174.

Sakota, K. y Okaya, T. (1976) *Effect of the hydrophilic nature of growing radicals on the formation of particles in the preparation of soap-free carboxylated polystyrene latexes.* J. Appl. Polym. Sci. 20: 3265-3274.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual.* 2° Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A.

Santos, R.M. y Forcada, J. (1996) *Synthesis and characterization of latex particles with acetal functionality*. Prog. Colloid Polym. Sci., 100: 87-90.

Santos, R.M. y Forcada, J. (2001) *Acetal-Functionalized Polymer Particles Useful for Immunoassays. III. Preparation of Latex-Protein Complexes and Their Applications* J. Mater. Sci.: Mater. Med. 12: 173-180.

Sanz-Izquierdo, M.P.; Martín-Molina, A.; Ramos, J.; Rus, A.; Borque, L.; Forcada, J. y Galisteo-González, F. (2004) *Amino, chloromethyl and acetal-functionalized latex particles for immunoassays: a comparative study*. J. Immunol. Methods, 287: 159-167.

Sarobe J. y Forcada J. (1996) *Synthesis of core-shell type polystyrene monodisperse particles with chloromethyl groups* Colloid Polym. Sci., 274: 8-13.

Sarobe, J.; Miraballes, I.; Molina, J.A.; Forcada, J. e Hidalgo-Álvarez, R. (1996) *Nephelometric assay of immunoglobulin G chemically bound to chloromethyl styrene beads*. Polymers for Advanced Technologies, 7: 749-753.

Sarobe, J.; Molina-Bolivar, J.A.; Forcada, J.; Galisteo, F. e Hidalgo-Álvarez, R. (1998) *Functionalized Monodisperse Particles with Chloromethyl Groups for the Covalent Coupling of Proteins* Macromolecules, 31: 4282-4287.

Seradyn Technical Bulletin, Particle Technology División, (1991) *Recommended Adsorption and Covalent Coupling Procedures*, Indianapolis, USA, pp 1-3.

Seebergh, J.E. y Berg, J.C. (1995) *Evidence of a Hairy Layer at the Surface of Polystyrene Latex Particles*. Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects 100: 139-153.

Serra, J.; Puig, J.; Martín, J.; Galisteo, F.; Galvez, M.J. e Hidalgo-Alvarez, R. (1992) *On the adsorption of IgG onto polystyrene particles: electrophoretic mobility and critical coagulation concentration*. Colloid Polym. Sci.. 270: 574-583.

Shapiro, A.L.; Viñuela, E. y Maizel, J.V.Jr. (1967) *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels*. Biochem Biophys Res Commun., 28:815-820.

Shechter, L.; Wynstra, J. y Kurkjy, R. (1956) *Glycidyl Ether Reactions with Amines*. Ind. Eng. Chem. 48: 94-97.

Shimizu, N.; Sugimoto, K.; Tang, J.; Nishi, T.; Sato, I.; Hiramoto, M.; Aizawa, S.; Hatakeyama, M.; Ohba, R.; Hatori, H.; Yoshikawa, T.; Suzuki, F.; Oomori, A.; Tanaka, H.; Kawaguchi, H.; Watanabe, H. y Handa, H. (2000) *High-performance affinity beads for identifying drug receptors*. Nat. Biotechnol. 18: 877-881.

Shirahama, H. y Suzawa, T. (1985) *Adsorption of bovine serum albumin onto styrene/acrylic acid copolymer latex*. Colloid Polym. Sci. 263: 141-146.

Singer, J.M. y Plotz, J.M. (1956) *The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis*. Am. J. Med., 21: 888-892.

Slomkowski, S.; Basinska, T. y Miksa, B. (2002) *New types of microspheres and microsphere-related materials for medical diagnostics*. Polym. Adv. Technol., 13: 905-918.

Smith, P.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.G.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goetze, N.M.; Olson, B.J. y Klenk, D.C. (1985) *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal. Biochem., 150: 76-85.

Smith, R. y Ts'ao, Ch. (1973) *Fibrin degradation products in the postoperative period. Evaluation of a new latex agglutination method*. Am. J. Clin. Pathol., 60: 644-647. (1973).

Smith, W.V. y Ewart, R.H. (1948) *Kinetics of Emulsion Polymerization* J. Chem. Phys., 16:592-599.

Snyder, L. y Champness, W. (2003) *Molecular Genetics of Bacteria, 2° Ed.* American Society for Microbiology Press, Washington (D.C.), U.S.A.

Sorin, T.; Ifuku, Y.; Sato, K.; Kohno, H.; Mizokami, M.; Tokuda, H.; Nakamura, M. y Yamamoto, M. (1989) *Development of an Automated Latex Photometric Immunoassay (LPIA) for Detection of Hepatitis B Surface Antigen (HBSAG)*. Clin. Chem. 35: 1206-.

Stenkamp, S.S. y Berg, J.C. (1997) *The Role of Long Tails in Steric Stabilization and Hydrodynamic Layer Thickness*. Langmuir, 13: 3827-3832.

Suen, C.H. y Morawetz, H. (1985) *Reactive latex studies, 2. Kinetics and retention of enzymatic activity in the covalent protein bonding to a polymer latex* Makromol. Chem., 186: 255-260.

Sundberg, L. y Porath, J. (1974) *Preparation of Adsorbents for Biospecific Affinity Chromatography I. Attachment of Group-Containing Ligands to Insoluble Polymers by Means of Bifunctional Oxiranes*. J. Chromatography, 90: 87-98.

Suzawa, T. y Shirahama, H. (1991) *Adsorption of plasma proteins onto polymer lattices*. Adv. Colloid Interface Sci. 35: 139-172.

Suzuki, Y.; Ramirez, R.; Press, C.; Li, S.; Parmley, S.; Thulliez, P. y Remington, J. (2000) *Detection of immunoglobulin M antibodies to P35 antigen of Toxoplasma gondii for serodiagnosis of recently acquired infection in pregnant women*. J. Clin. Microbiol. 38: 3967-3970.

Swets J.A y Pickett R.M. (1982) *Evaluation of Diagnostic Systems: Methods from Signal Detection Theory*. Academic Press, London, U.K. pp. 253.

Tijssen, P. (1985) *Practice and Theory of Enzyme Immunoassay*, Elsevier, Amsterdam, Países Bajos.

Tsaur, L. y Fitch, R.M. (1987) *Preparation and properties of polystyrene model colloids: I. Preparation of surface-active monomer and model colloids derived therefrom*. J. Colloid Interface Sci., 115: 450-462.

Turková, J. (1999) *Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function* J. Chrom. B., 722: 11-31.

Van Gelder, P.; Bosman, F.; De Meuter, F.; Van Heuverswyn, H. y Herionlt, P. (1993) *Serodiagnosis of toxoplasmosis by using a recombinant form of the 54-kilodalton rhostry antigen expressed in Escherichia coli*. J. Clin. Microb. 31: 9-15.

Van Loon, A.M. y Van der Veen, J. (1980) *Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of toxoplasma antibodies in human sera*. J Clin Pathol. 33: 635-639.

Van Steirteghem, A.C.; Zweig, M.H.; Robertson, E.A.; Bernard, R.M.; Putzeys, G.A. y Bieva, C.J. (1982) *Comparison of effectiveness of four clinical chemical assays in classifying patients with chest pain*. Clin. Chem. 28: 1319-1324.

Vanderhoff, J.V.; El-Aasser, M.S.; Micale, F.J.; Sudol, E.D.; Tseng, C.M.; Silwanowicz, A.; Kornfeld, D.M. y Vicente, F.A. (1984) *Preparation of Large-Particle-Size Monodisperse Latexes in Space: Polymerization Kinetics and Process Development* J. Dispers. Sci. Technol. 5: 231-246.

Voller, A.; Bidwell, D.E. y Bartlett, A. (1976) *Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice*. Bull. World Health Organ., 53: 55-65.

Wang, H.; Zhang, Y.; Yan, B.; Liu, L.; Wang, S.; Shen, G. y Yu, R. (2006) *Rapid, simple, and sensitive immunoagglutination assay with SiO₂ particles and quartz crystal microbalance for quantifying Schistosoma japonicum antibodies*. Clin. Chem. 52: 2065-2071.

Weber, D.R.; Douglass, L.E.; Brundage, W.G. y Stallkamp, T. C. (1969) *Acute varieties of melioidosis occurring in U. S. soldiers in Vietnam*. Amer. J. Med. 46: 234-244.

Wild, D. (Ed) (1994) *The Immunoassay Handbook*. Stockton Press, New York, U.S.A.

Wu, S. y Zhang, Y. (2007) *LOMETS: a local meta-threading-server for protein structure prediction*. Nucl Acids Res, 35: 3375-3382.

Wu, S. y Zhang, Y. (2008) *A comprehensive assessment of sequence-based and template-based methods for protein contact prediction*. Bioinformatics, 24: 924-231.

Yalow, R.S. y Berson, S.A. (1959) *Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods* Nature, 184: 1648-1649.

Yalow, R.S. y Berson, S.A. (1960) *Immunoassay of endogenous plasma insulin in man*. J. Clin. Invest., 39: 1157-1175.

Yamamoto, J.H.; Vallochi, A.L. y Silveira C. (2000) *Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens*. J Infect Dis. 181:2018-2022.

Yan, C.; Zhang, X.; Sun, Z.; Kitano, H. e Ise, N. (1990) *Poly(styrene-co-acrolein) latex particles: Copolymerization and characteristics*. J. Appl. Polym. Sci., 40: 89-98.

Yang, J.; Hua, Q.; Chen, H.; Lv, J.; Chen, B. y Ruan, Z. (2010) *A rapid assay for detecting antibody against Bluetongue virus with a latex agglutination test using recombinant VP7 antigen*. J. Vet. Diagn. Invest. 22: 242-244.

Zhang, Y. (2007) *Template-based modeling and free modeling by I-TASSER in CASP7 Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* 69: 108-117.

Zhang, Y.; Liu, X.S.; Liu, Q.R. y Wei, L. (2006) *Genome-wide in silico identification and analysis of cis natural antisense transcripts (cis-NATs) in ten species*. Nucleic Acids Res. 34: 3465-3475.

Zhou, L.; Dai, J. y Zhan, F. (2013) *Preparation and Effects of Polystyrene Microspheres by Dispersion Polymerization*. Mat. Sci. 3: 40-44.

Zweig, M.H. (1992) *Inefficiency of diagnostic efficiency*. Clin. Chem. 38: 163-164.

Zweig, M.H. y Campbell, G. (1993) *Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine*. Clin. Chem. 39:561-577.

Zweig, M.H.; Broste, S.K. y Reinhart, R.A. (1992) *ROC curve analysis: an example showing the relationships among serum lipid and apolipoprotein concentrations in identifying patients with coronary adery disease*. Clin. Chem. 38: 1425-1428.

Zwetsloot, J.P.H. y Leyte, J.C. (1994) *Conductometric Titration of Latex with Acidic Surface Groups*, J. Colloid Interface Sci., 163: 362-371.