

Subido por:



Interfase IQ

Libros de Ingeniería Química y más



<https://www.facebook.com/pages/Interfase-IQ/146073555478947?ref=bookmarks>

**Si te gusta este libro y tienes la posibilidad,
cómpralo para apoyar al autor.**

QUÍMICA BIOANALÍTICA

MÉTODOS Y TEORÍA ANALÍTICA PARA EL
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR,
FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Susan R. Mikkelsen - Eduardo Cortón

 Peudeba



Manuales

QUÍMICA BIOANALÍTICA

MÉTODOS Y TEORÍA ANALÍTICA PARA EL
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR,
FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Susan R. Mikkelsen - Eduardo Cortón

 *Peudeba*

Corton, Eduardo

Química bioanalítica / Eduardo Corton y Susan Mikkelsen. - 1a ed. - Buenos Aires : Eudeba, 2011.

432 p. ; 25x18 cm.

ISBN 978-950-23-1769-4

1. Química. I. Mikkelsen, Susan II. Título
CDD 540.711



Eudeba

Universidad de Buenos Aires

1ª edición: febrero de 2011

© 2011

Editorial Universitaria de Buenos Aires

Sociedad de Economía Mixta

Av. Rivadavia 1571/73 (1033) Ciudad de Buenos Aires

Tel: 383-8025 / Fax: 383-2202

www.eudeba.com.ar

Corrección, tapa y composición general: Eudeba

Impreso en Argentina.

Hecho el depósito que establece la ley 11.723



No se permite la reproducción total o parcial de este libro, ni su almacenamiento en un sistema informático, ni su transmisión en cualquier forma o por cualquier medio, electrónico, mecánico, fotocopia u otros métodos, sin el permiso previo del editor.

AGRADECIMIENTOS

El apoyo de nuestros colegas en Concordia University, University of Waterloo y en la Universidad de Buenos Aires, durante la preparación de este libro, es amablemente agradecido.

También queremos agradecer la paciencia y apoyo de nuestras familias y amigos, los que entendieron nuestros esfuerzos y soportaron nuestra desatención, necesaria para la finalización de este proyecto.

Susan R. Mikkelsen
Eduardo Cortón
Buenos Aires, Argentina
Marzo de 2010

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1: MÉTODOS PARA CARACTERIZAR LA MATRIZ ANALÍTICA.....	15
1.1 Introducción.....	15
1.2 Proteínas totales.....	17
1.2.1 Método de Lowry.....	17
1.2.2 Método de Smith (BCA).....	18
1.2.3 Método de Bradford.....	19
1.2.4 Método de la ninhidrina.....	20
1.2.5 Otros métodos de cuantificación.....	21
1.3 DNA total.....	23
1.3.1 Método del ácido diaminobenzoico (DABA).....	23
1.3.2 Método de la difenilamina (DPA).....	24
1.3.3 Otros métodos fluorométricos.....	25
1.4 RNA total.....	26
1.5 Carbohidratos totales.....	27
1.5.1 Método del ferricianuro.....	27
1.5.2 Método del fenol / ácido sulfúrico (phenol-sulfuric acid method).....	28
1.5.3 Método del 2-aminotiofenol.....	29
1.5.4 Método del reactivo púrpura para polisacáridos bacterianos.....	29
1.6 Acidos grasos libres.....	30
1.7 Problemas.....	31
CAPÍTULO 2: ENZIMAS.....	33
2.1 Introducción.....	33
2.2 Nomenclatura enzimática.....	35
2.3 Clasificación de las enzimas.....	36
2.4 Enzimas en química bioanalítica.....	37
2.5 Cinética enzimática.....	39
2.5.1 Cinética enzimática de enzimas que utilizan un único sustrato.....	41
2.5.2 Determinación experimental de los parámetros de Michaelis-Menten.....	43

2.5.3 Comparación de métodos para la determinación del K_m	46
2.5.4 Cinética de enzimas con un sustrato y dos productos.....	48
2.5.5 Cinética enzimática de enzimas que utilizan dos sustratos	48
2.5.6 Ejemplos de reacciones catalizadas por enzimas y su análisis	51
2.6 Activadores enzimáticos	52
2.7 Inhibidores enzimáticos	53
2.7.1 Inhibición competitiva	54
2.7.2 Inhibición no-competitiva.....	55
2.7.3 Inhibición acompetitiva	56
2.8 Unidades enzimáticas y concentraciones.....	56
2.9 Lecturas sugeridas.....	59
2.10 Problemas.....	59
CAPÍTULO 3: CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS Y SUS SUSTRATOS.....	63
3.1 Introducción	63
3.2 Depleción de sustrato y acumulación de producto	64
3.3 Mediciones directas y acopladas.....	65
3.4 Clasificación de métodos	68
3.5 Métodos instrumentales	71
3.5.1 Métodos ópticos.....	71
3.5.2 Detección electroquímica	78
3.5.3 Otros métodos de detección.....	80
3.6 Ensayos de ultra alto rendimiento (ultra-high-throughput assays)	82
3.7 Consideraciones prácticas para los análisis enzimáticos	83
3.8 Lecturas sugeridas.....	84
3.9. Problemas.....	84
CAPÍTULO 4: ENZIMAS INMOVILIZADAS.....	87
4.1 Introducción	87
4.2 Métodos de inmovilización.....	88
4.2.1 Inmovilización covalente sin polimerización	89
4.2.2 Entrecruzamiento con reactivos bifuncionales	96
4.2.3 Adsorción.....	97
4.2.4 Inclusión	98
4.2.5 Microencapsulación.....	99
4.3 Propiedades de las enzimas inmovilizadas	99
4.4 Reactores con enzimas inmovilizadas	106
4.5 Tratamiento teórico de los reactores enzimáticos de lecho empacado	109
4.6 Lecturas sugeridas.....	112
4.7 Problemas.....	112

CAPÍTULO 5: ANTICUERPOS.....	115
5.1 Introducción.....	115
5.2 Propiedades estructurales y funcionales de los anticuerpos	116
5.3 Anticuerpos policlonales y monoclonales	119
5.4 Interacciones antígeno-anticuerpo.....	121
5.5 Aplicaciones analíticas de las interacciones secundarias antígeno-anticuerpo.....	123
5.5.1 Reacciones de aglutinación.....	123
5.5.2 Reacciones de precipitación	125
5.6 Lecturas sugeridas.....	128
5.7 Problemas.....	128
CAPÍTULO 6: INMUNOENSAYOS CUANTITATIVOS UTILIZANDO MARCADORES (LABELS).....	131
6.1 Introducción.....	131
6.2 Reacciones de marcado.....	133
6.3 Inmunoensayos heterogéneos	135
6.3.1 Métodos utilizando anticuerpo marcado.....	137
6.3.2 Métodos utilizando ligando marcado.....	138
6.3.3 Radioisótopos	140
6.3.4 Fluoróforos	140
6.3.5 Marcadores quimioluminiscentes	143
6.3.6 Marcas enzimáticas.....	145
6.4 Inmunoensayos homogéneos	149
6.4.1 Marcas fluorescentes.....	150
6.4.2 Marcadores enzimáticos	152
6.5 Evaluación de nuevos inmunoensayos.....	156
6.6 Lecturas sugeridas.....	162
6.7 Problemas.....	162
CAPÍTULO 7: BIOSENSORES.....	167
7.1 Introducción.....	167
7.2 Respuesta de los biosensores enzimáticos	169
7.3 Ejemplos de biosensores.....	172
7.3.1 Sensor amperométrico para glucosa mediado por ferroceno.....	172
7.3.2 Biosensor potenciométrico para fenil acetato.....	174
7.3.3 Inmunosensor potenciométrico para digoxina.....	175
7.3.4 Biosensor basado en fluorescencia de onda evanescente para bungarotoxina	176
7.3.5 Biosensor óptico para glucosa basado en transferencia de energía de fluorescencia	178
7.3.6 Sensor piezoeléctrico para la detección de ácidos nucleicos.....	180
7.3.7 Termistores enzimáticos	181

7.4 Evaluación del funcionamiento de los biosensores	183
7.5 Lecturas sugeridas.....	185
7.6 Problemas.....	186
CAPITULO 8: EVOLUCIÓN DIRIGIDA PARA EL DISEÑO DE REACTIVOS MACROMOLECULARES PARA BIOENSAYOS.....	189
8.1 Introducción	189
8.2 Diseño racional y evolución dirigida	191
8.3 Generación de la diversidad genética	194
8.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa y PCR propensa al error.....	195
8.3.2 Mezclado de DNA	197
8.4 Relacionando el genotipo y el fenotipo	198
8.4.1 Expresión celular y presentación en la superficie celular (<i>in vivo</i>)	199
8.4.2 Presentación en fago (<i>in vivo</i>).....	200
8.4.3 Presentación en ribosoma (<i>in vitro</i>)	201
8.4.4 Fusión péptido-mRNA (<i>in vitro</i>)	203
8.4.5 Microcompartimerización (<i>in vitro</i>)	203
8.5 Identificación y selección de las variantes exitosas	203
8.5.1 Identificación de variantes exitosas por afinidad	204
8.5.2 Identificación de las variantes exitosas basada en actividad catalítica	205
8.6 Evolución dirigida de la galactosa oxidasa.....	207
8.7 Lecturas sugeridas.....	208
8.8 Problemas.....	209
CAPÍTULO 9: PRINCIPIOS DE ELECTROFORESIS.....	211
9.1 Introducción	211
9.2 Medios soporte electroforéticos.....	215
9.2.1 Papel	215
9.2.2 Geles de almidón	217
9.2.3 Geles de poliacrilamida	219
9.2.4 Geles de agarosa	223
9.2.5 Geles de poliacrilamida-agarosa.....	224
9.3 Efecto de las condiciones experimentales en las separaciones electroforéticas	224
9.4 Gradientes de fuerza del campo eléctrico	225
9.5 Detección de proteínas y ácidos nucleicos después de la separación electroforética...	227
9.5.1 Tinciones y colorantes	228
9.5.2 Detección de enzimas mediante la tinción por sustrato.....	230
9.5.3 El Southern blot	232
9.5.4 El northern blot	233
9.5.5 El western blot	233
9.5.6 Detección de fragmentos de DNA sobre membranas con sondas de DNA	234

9.6 Lecturas sugeridas.....	237
9.7 Problemas.....	238
CAPÍTULO 10: APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS DE ZONA.....	239
10.1 Introducción.....	239
10.2 Determinación de la carga neta de proteínas y peso molecular utilizando PAGE.....	239
10.3 Determinación de la estructura cuaternaria de proteínas y el peso molecular de subunidades.....	241
10.4 Peso molecular de DNA utilizando electroforesis en geles de agarosa.....	243
10.5 Identificación de isoenzimas.....	244
10.6 Diagnóstico de enfermedades genéticas (heredadas).....	245
10.7 Huella dactilar de DNA (DNA fingerprinting) y polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción.....	248
10.8 Secuenciación del DNA con el método de Maxam-Gilbert.....	251
10.9 Inmunolectroforesis.....	256
10.10 Lecturas sugeridas.....	260
10.11 Problemas.....	260
CAPÍTULO 11: ISOELECTROENFOQUE.....	263
11.1 Introducción.....	263
11.2 Anfólitos carrier.....	265
11.3 Técnicas modernas de IEF con anfólitos carrier.....	267
11.4 Gradientes de pH inmovilizados (IPGs).....	270
11.5 Electroforesis bidimensional.....	274
11.6 Lecturas sugeridas.....	278
11.7 Problemas.....	278
CAPÍTULO 12: ELECTROFORESIS CAPILAR.....	281
12.1 Introducción.....	281
12.2 Electroósmosis.....	283
12.3 Elución de los componentes de la muestra.....	284
12.4 Introducción de la muestra.....	285
12.5 Detectores para electroforesis capilar.....	287
12.5.1 Detección por fluorescencia inducida por láser.....	288
12.5.2 Detección por espectrometría de masas.....	290
12.5.3 Detección amperométrica.....	294
12.5.4 Detección radioquímica.....	297
12.6 Electroforesis capilar en gel de poliacrilamida (C-PAGE).....	298
12.7 Enfoque isoelectrónico capilar (CIEF).....	300
12.8 Lecturas sugeridas.....	301
12.9 Problemas.....	301

CAPÍTULO 13: CENTRIFUGACIÓN.....	305
13.1 Introducción.....	305
13.2 Sedimentación y fuerza centrífuga relativa, g	306
13.3 Fuerza centrífuga en diferentes tipos de rotor	308
13.3.1 Rotores oscilantes	308
13.3.2 Rotores de ángulo fijo.....	308
13.3.3 Rotores verticales.....	310
13.4 Factor de clarificación (<i>clearing factor</i>)	310
13.5 Gradientes de densidad	311
13.5.1 Materiales utilizados para generar un gradiente	312
13.5.2 Construcción de gradientes pre-formados y auto-formados.....	313
13.5.3 Redistribución del gradiente en rotores de ángulo fijo y verticales.....	314
13.6 Diferentes técnicas utilizadas.....	315
13.6.1 Centrifugación diferencial	315
13.6.2 Centrifugación de velocidad-zonal	317
13.6.3 Centrifugación isopícnica	318
13.7 Colectando las muestras.....	318
13.8 Ultracentrifugación analítica	318
13.8.1 Instrumentación	319
13.8.2 Análisis de velocidad de sedimentación	322
13.8.3 Análisis de equilibrio de sedimentación	325
13.9 Ejemplos seleccionados	325
13.9.1 Centrifugación analítica para la determinación de estructuras cuaternarias	325
13.9.2 Separación de retrovirus en gradientes auto-generados.....	327
13.9.3 Separación de lipoproteínas de plasma humano.....	328
13.10 Lecturas sugeridas.....	329
13.11 Problemas.....	329
 CAPÍTULO 14: CROMATOGRAFÍA DE BIOMOLÉCULAS.....	 331
14.1 Introducción.....	331
14.2 Unidades y definiciones.....	332
14.3 Teoría de los platos teóricos.....	333
14.4 Teoría cinética.....	333
14.5 Cromatografía de exclusión molecular (filtración en gel)	336
14.6 Matrices de gel para cromatografía de exclusión molecular	342
14.7 Cromatografía de afinidad	344
14.7.1 Inmovilización de ligandos de afinidad	346
14.7.2 Métodos de elución.....	348
14.7.3 Determinación de las constantes de asociación mediante cromatografía de afinidad de alta performance	349

14.8 Cromatografía de intercambio iónico	353
14.8.1 Modelo de retención para la cromatografía de intercambio iónico de polielectrolitos	354
14.9 Lecturas sugeridas.....	359
14.10 Problemas.....	359
CAPÍTULO 15: ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BIOMOLÉCULAS.....	361
15.1 Introducción.....	361
15.2 Descripción básica de la instrumentación.....	363
15.2.1 Fuentes de ionización “suaves”	364
15.2.2 Analizadores de masa	367
15.2.3 Detectores	372
15.3 Interpretación de los espectros de masa.....	372
15.4 Determinación del peso molecular de biomoléculas	377
15.5 Identificación de proteínas	379
15.6 Secuenciación de péptidos y proteínas	381
15.7 Métodos aplicables a los ácidos nucleicos.....	385
15.8 Espectrometría de masa de bacterias	387
15.9 Lecturas sugeridas.....	389
15.10 Problemas.....	389
CAPÍTULO 16: VALIDACIÓN DE NUEVOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS.....	391
16.1 Introducción.....	391
16.2 Precisión y exactitud.....	393
16.3 Media y varianza.....	394
16.4 RSD y otros estimadores de precisión	394
16.4.1 Distribución de errores y límites de confianza	395
16.4.2 Regresión lineal y calibración	396
16.4.3 Perfiles de precisión.....	398
16.4.4 Límite de cuantificación y detección	399
16.4.5 Linealización de curvas sigmoideas (modelo Log-Logit de cuatro parámetros)..	400
16.4.6 Método de la dosis efectiva	401
16.5 Estimación de la exactitud	402
16.5.1 Estandarización.....	402
16.5.2 Efectos de la matriz	403
16.5.3 Interferencias	404
16.6 Ensayos cualitativos (cribado o “screening”)	405
16.6.1 Figuras de merito para ensayos cualitativos (cribado).....	406
16.7 Ejemplos de los procedimientos de validación.....	406
16.7.1 Validación de un ensayo cualitativo para susceptibilidad a antibióticos	406

16.7.2 Medición de homocisteína en plasma mediante inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA)	408
16.7.3 Determinación de la actividad enzimática de β -Galactosidasa	412
16.7.4 Establecimiento de un valor de corte para un análisis semi-cuantitativo para canabinoides.....	414
16.8 Lecturas sugeridas.....	416
RESPUESTAS A LOS PROBLEMAS	417
Capítulo 1.....	417
Capítulo 2.....	417
Capítulo 3.....	418
Capítulo 4.....	419
Capítulo 5.....	420
Capítulo 6.....	421
Capítulo 7.....	421
Capítulo 8.....	422
Capítulo 9.....	422
Capítulo 10.....	423
Capítulo 11.....	423
Capítulo 12.....	424
Capítulo 13.....	424
Capítulo 14.....	425
Capítulo 15.....	425
ÍNDICE ALFABÉTICO	427

CAPÍTULO 1

MÉTODOS PARA CARACTERIZAR LA MATRIZ ANALÍTICA

1.1 Introducción

El objetivo de muchos ensayos analíticos es la detección con alta selectividad de un solo tipo de **analito** biomolecular, como, por ejemplo, una enzima o anticuerpo en particular, o la determinación de la presencia o ausencia de una dada secuencia de DNA en una muestra incógnita. Métodos para este tipo de ensayos, donde la alta selectividad es un requisito, serán considerados en próximos Capítulos.

Cuando muy poca información esta disponible acerca de una muestra, por ejemplo durante la separación o purificación de una proteína u otra biomolécula, es normalmente importante caracterizar la matriz analítica de la muestra, analizando los grupos mayoritarios de moléculas que componen la matriz en distinta proporción, acompañado la especie de interés. Este proceso de caracterización se lleva a cabo utilizando métodos que cuantifican la totalidad de los diferentes grupos mayoritarios de biomoléculas.

En estudios bioquímicos, a menudo se estima la cantidad total de proteína y ácidos nucleicos en una muestra utilizando el método del nomograma.¹ En este método, la absorbancia de la muestra colocada en una cubeta estándar (1 cm de camino óptico) se mide a 260 y 280 nm. El nomograma (Figura 1.1) es luego utilizado para estimar las concentraciones.

El método del nomograma es sencillo y rápido, ya que no es necesario realizar operaciones o reacciones químicas o físicas, pero tiene varias desventajas. Son interferencia cualquier sustancia presente en la muestra, además de las proteínas y los ácidos nucleicos, que absorban en las longitudes de onda (λ) respectivas. En muchos protocolos de purificación de ácidos nucleicos se utilizan altas concentración de fenol, el cual absorbe en ambas λ (260 y 280 nm) dando lugar a errores por exceso (sobreestimación) de las cantidades totales de ácidos nucleicos. Además de este inconveniente, el método no distingue entre DNA y RNA, y es solamente útil para muestras que contienen una concentración relativamente alta de proteína y / o ácidos nucleicos, debido a su baja sensibilidad.

1. R.R. Alexander y J.M. Griffiths, “*Basic Biochemical Methods*”, Wiley-Liss, New York, 1993. pp. 29-31.

NOMOGRAMA

Por E. Adams

Basado en el coeficiente de extinción para enolasa y ácido nucleico dados por Warbug y Christian, *Biochem. Z.* 310, 384 (1942).

INSTRUCCIONES: Usando una cubeta de un cm de paso óptico, determine la densidad óptica de la solución a 260 y 280 nm. Coloque un borde recto de tal manera que intersecte las lecturas observadas en las escalas a 260 y 280 nm. Lea las concentraciones de proteínas y ácidos nucleicos donde el borde recto cruza las escalas del lado izquierdo y derecho, respectivamente.

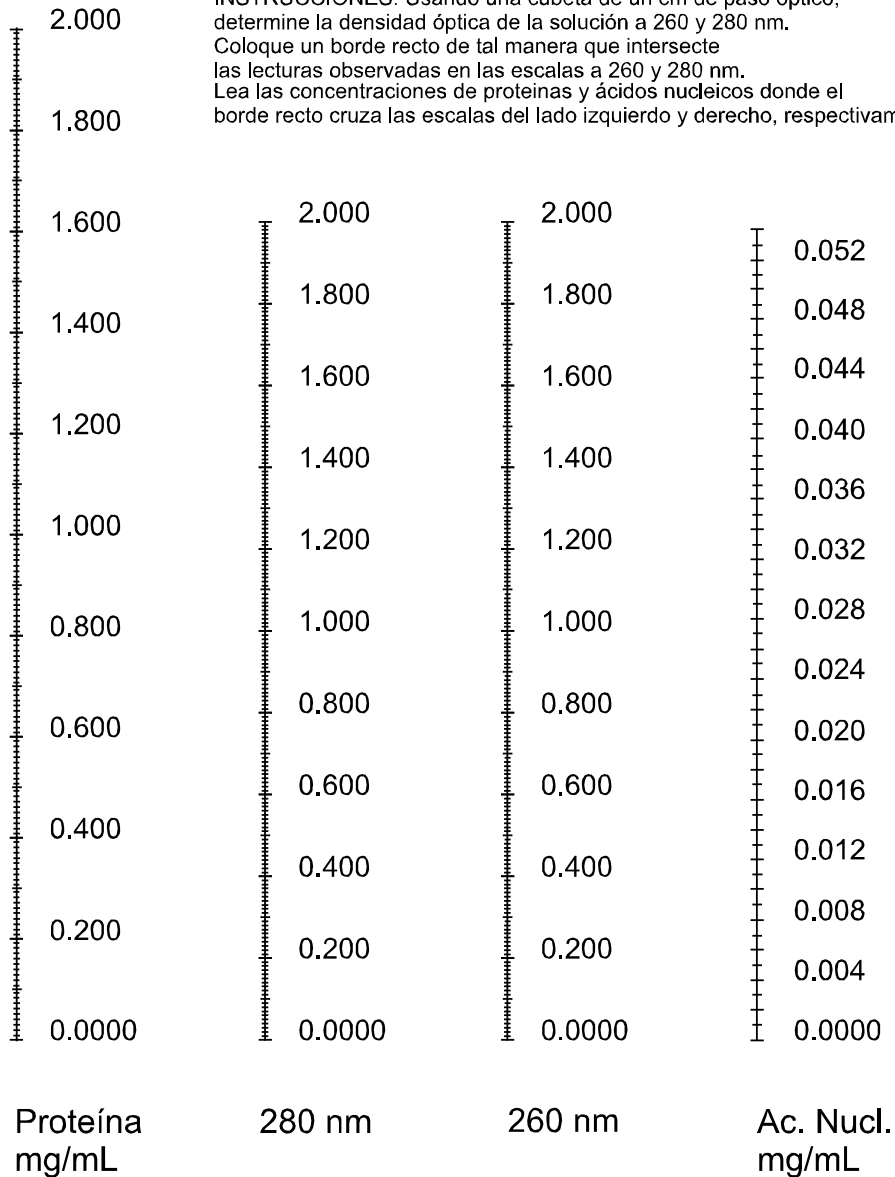


Figura 1.1. Nomograma utilizado para estimar la concentración de proteínas y ácidos nucleicos totales. Reproducido con permiso, Calbiochem, San Diego, CA.

En este Capítulo serán consideradas técnicas que emplean métodos sencillos espectrofotométricos y espectrofluorométricos para la cuantificación de proteínas totales, DNA, RNA, carbohidratos y ácidos grasos libres. Todos los métodos están basados en la generación de una molécula coloreada (cromóforo) o fluorescente (fluoróforo) mediante una reacción química selectiva.

1.2 Proteínas totales²

Los tres ensayos mas utilizados para estimar la concentración total de proteínas son el métodos de Lowry (cobre alcalino), Smith (ácido bicínico, BCA) y Bradford (Coomassie Blue). Todos ellos son métodos colorimétricos, basados en la generación de especies que absorben a determinada λ en proporción con la cantidad de proteína presente en la muestra. El ensayo de la ninhidrina es un método promisorio relativamente más moderno.

1.2.1 Método de Lowry

El método de Lowry (una versión mejorada del denominado método del fenol), comienza con la adición de una solución alcalina de Cu^{2+} a la muestra. El cobre forma un complejo con los átomos de nitrógeno de las uniones peptídicas de las proteínas bajo condiciones fuertemente alcalinas, y es reducido a Cu^+ . Luego, el Cu^+ y los grupos R de la tirosina, triptofano y cisteína que forman la proteína, reaccionan con el reactivo de Folin y Ciocalteu; este reactivo contiene tungstato sódico, molibdato sódico, ácido fosfórico y HCl ($\text{W}^{6+}/\text{Mo}^{6+}$). Durante esta reacción, el Cu^+ es oxidado a Cu^{3+} , el que entonces reacciona con la cadena peptídica produciendo un imino péptido ($\text{R}_1\text{-CO-N=C(R}_2\text{)-CO-R}_3$) mas Cu^{2+} , y el reactivo de Folin es reducido transformándose en un cromóforo de color azul, denominado molibdeno/tungsteno azul (molybdenum/tungsten blue). La absorbancia puede ser medida en cubetas de vidrio o poliestireno a 720 nm, o si el valor de la absorbancia es demasiado alta (>2), a 500 nm.

Una curva de calibración obtenida utilizando soluciones estándar de proteínas (por ejemplo seroalbúmina bovina, BSA) se utiliza para obtener el valor de proteína total en la muestra. Bajo condiciones óptimas, y en ausencia de cadenas laterales reactivas, se ha demostrado que 2 electrones son transferidos por cada tetrapéptido; sin embargo, proteínas con un contenido importante de prolina o hidroxiprolina, o con cadenas laterales que pueden complejar cobre (como el glutamato) producen menos color. Los grupos laterales de cisteína,

2. C.M. Stoscheck, *Methods Enzymol.* **182**, 1990, 50-68, y referencias incluidas.

3. G. Legler, C.M. Muller-Platz, M. Mentges-Hettkamp, G. Pflieger y E. Julich, *Anal. Biochem.* **150**, 1985, 278-287.

tirosina y triptofano contribuyen con uno, cuatro y cuatro electrones, respectivamente.³ Debe tenerse en cuenta que diferentes proteínas producirán una intensidad de color diferente, debido principalmente a diferencias en los contenidos de tirosina y triptofano.

Si todos los reactivos han sido preparados previamente, el ensayo de Lowry requiere aproximadamente una hora. 400 μL de muestra son utilizados, conteniendo entre 2-100 μg de proteína (5-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Curvas de calibración no lineales se obtienen, debido a la descomposición del reactivo de Folin a pH alcalino luego de la adición de la muestra, lo que resulta en una reacción incompleta. Interferencias analíticas incluyen aquellas sustancias que pueden acidificar la solución, quelar el cobre, o causar reducción del cobre (II).

1.2.2 Método de Smith (BCA)

El método de Smith para cuantificar proteínas totales esta basado también en la complejación de cobre (II) con pépticos en condiciones alcalinas, con reducción a cobre (I). El ligando ácido bicincónico (BCA) es luego agregado en exceso produciendo color púrpura (absorbancia máxima a 562 nm). El color se desarrolla debido a la unión de BCA con Cu^+ en la relación 2:1 (Figura 1.2).

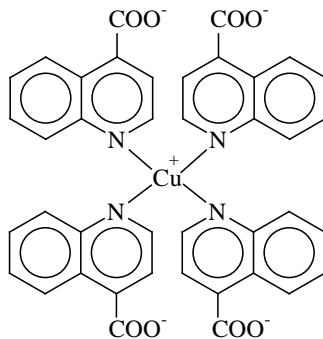


Figura 1.2. Complejo formado mediante reacción de ácido bicincónico con Cu^+ .

El método de Smith demora aproximadamente una hora, muestras con un volumen mínimo de 500 μL conteniendo de 0,2 a 50 μg de proteína son usualmente cuantificadas (0,4-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Similarmente al método de Lowry, las curvas de calibración son no-lineales, con desviación negativa a alta concentración de proteína. Interferencias incluyen agentes reductores del cobre (como los azúcares reductores) y agente complejantes, así como también sustancias con fuerte reacción ácida en la muestra incógnita. Lípidos presentes en las membranas celulares, incluyendo fosfolípidos, han sido descriptos como interferencias; una concentración aparente de 17 μg de proteína (como BSA) ha sido determinada al medir

100 μg de 1,3-dilinooleoglicerol.⁴ Como el BCA es un reactivo estable a pH alcalino, puede ser agregado al reactivo de cobre alcalino, de tal manera que solamente una adición de reactivo es necesaria. El método de Smith ha sido adaptado para placas multipozo de 96 pozos⁵, siendo lineal la dependencia entre absorción (570 nm) y concentración de proteína más allá del rango de concentración 1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, utilizando muestras de muy pequeño volumen (10 μL).

1.2.3 Método de Bradford

El método de Bradford esta basado en la unión no covalente de la forma aniónica del colorante Coomassie Blue G-250 con la proteína.⁶ El colorante reacciona fuertemente con los residuos de arginina, los que tienen una cadena lateral cargada positivamente; interacciones menos fuertes han sido observadas con residuos básicos (histidina y lisina) y aromáticos (tiro-sina, triptofano y fenilalanina). En ausencia de proteínas, el colorante es rojo pálido, mientras que cuando se produce la unión a proteínas el colorante se torna azulado, con una absorbancia máxima a 590 nm. La estructura de este colorante puede observarse en la Figura 1.3.

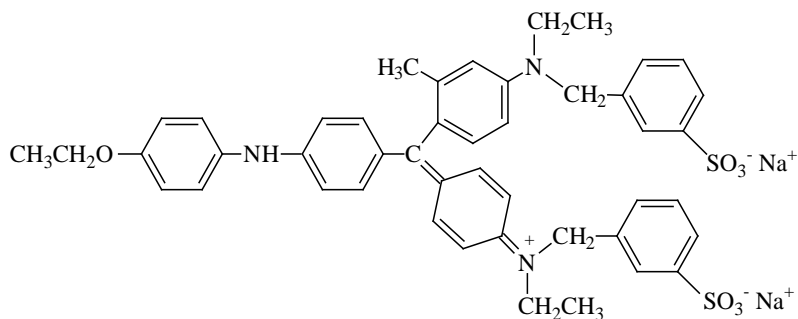


Figura 1.3. Coomassie Blue G-250, utilizado en método de Bradford para medir proteínas totales.

El método de Bradford es muy popular porque es rápido (5 minutos) e involucra una única adición de reactivos a la muestra. El método produce una curva de calibración no lineal cuando se mide la absorbancia a 590 nm (A_{590}) respecto a la concentración de proteínas totales en el rango de 0,2-20 μg de proteína, cuando 20 μL de muestra son utilizados (10-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Desviaciones negativas a la linealidad ocurren con este método, así como también con los métodos de Lowry y Smith. En el método de Bradford, la curvatura es debido a la depleción de colorante libre cuando la concentración de proteína es alta; una mejor aproximación

4. R.J. Kessler y D.D. Fanestil, *Anal. Biochem.* **159**, 1986, 138-142.
5. M.G. Redinbaugh y R.B. Turley, *Anal. Biochem.* **153**, 1986, 267-271.
6. S. J. Compton y C.G. Jones, *Anal. Biochem.* **151**, 1985, 369-374.

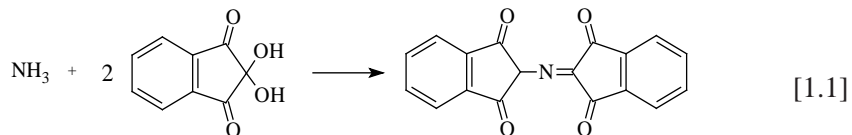
(linealidad a altas concentraciones de proteína) puede obtenerse graficando $A_{595}-A_{465}$ versus concentración, de tal manera de considerar el agotamiento del colorante.

Los métodos de Lowry y Bradford han sido comparados cuando se utilizan para medir muestras conteniendo fracciones de membrana celular.⁷ Mientras que el método de Lowry brinda resultados reproducibles (inclusive luego de conservar las muestras dos semanas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), el método de Bradford significativamente subestima la concentración de proteínas de membrana, inclusive luego de tratamiento con bases o surfactantes; lo mismo ocurre (subestimación) si se miden muestras conservadas durante largos periodos de tiempo. Homogenatos de cerebro de rata medidos con el método de Bradford han informado inicialmente solo el 52% de la proteína medida utilizando el método de Lowry; luego de 14 días con las muestras congeladas, este valor ha decrecido hasta aproximadamente el 30%. Debido a que los lípidos de membrana y fosfolípidos interfieren en el método de Smith, las proteínas de membrana deberían ser cuantificadas utilizando el método de Lowry, o mediante el método de la ninhidrina descripto más abajo.

1.2.4 Método de la Ninhidrina⁸

Este método esta basado en la cuantificación de los aminoácidos totales liberados luego de hidrólisis ácida de las proteínas presentes en muestras de tejido. Placas multipozo son utilizadas en este ensayo. Muestras de tejido (10 μg) son primeramente hidrolizadas en 500 μL de HCl 6 M a 100°C durante 24 h para liberar amonio. Las muestras son luego liofilizadas (enfriadas y sometidas a vacío), y el residuo, conteniendo amonio, se disuelve en un volumen conocido de agua.

El reactivo de ninhidrina, conteniendo ninhidrina, etilenglicol, buffer acetato y suspensión de cloruro estañoso, inicialmente de un color rojo pálido, se agrega a 1-10 μg de hidrolizado proteico en una placa multipozo de fondo plano. Se procede a incubar 10 minutos a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante los que el amonio reacciona con el reactivo de ninhidrina produciendo dicetohidrindiliden-dicetohidrindamina (diketohydrindylidene-diketohydrindamine) (Ecuación 1.1, abajo).



En estas condiciones, el producto absorbe fuertemente entre 560-580 nm, y un lector de placas multipozo puede ser utilizado para medir la absorbancia a 575 nm. Se ha estudiado

7. L.P. Kirazov, L.G. Venkov y E.P. Kirazov, *Anal. Biochem.* **208**, 1993, 44-48.
8. B. Starcher, *Analytical Biochemistry* **292**, 2001, 125-129.

la correlación entre absorbancia y concentración utilizando distintas proteínas como estándares, como se observa en la Figura 1.4, en la que se compara el método de la ninhidrina con resultados obtenidos utilizando el método de Bradford. Estos datos demostraron mejor sensibilidad con el método de la ninhidrina (mayor pendiente en las rectas obtenidas), y sugiere una mejora de aproximadamente 10 veces en el límite de detección. Una ventaja importante de este método es que las diferencias entre las curvas de calibración utilizando diferentes proteínas estándares son relativamente pequeñas. Interferencias incluyen aminoácidos libres así como otros compuestos conteniendo grupos amino.

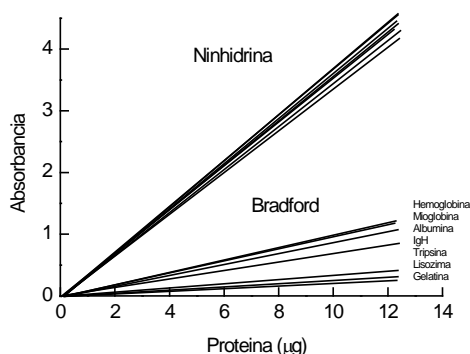


Figura 1.4. Comparación de resultados obtenidos utilizando el método de la ninhidrina y el método de Bradford para proteínas totales en muestras de tejido. Las proteínas son las mismas en ambos ensayos.⁸ Reproducido con permiso, Starcher, *Analytical Biochemistry* **292**, 2001, 125-129. “A Nirhydrin-Based Assay to Quantitate the Total Protein Content of Tissue Samples”. Copyright © 2001 by Academic Press.

1.2.5 Otros métodos de cuantificación.

El método de la “nitrición” ha sido utilizado para cuantificar proteínas. En este método, los residuos aromáticos de los aminoácidos son tratados con ácido nítrico; los productos de la nitrición absorben a 358 nm. En el caso de la tirosina, la nitrición ocurre en la posición 3- del anillo aromático, produciendo 3-nitrotirosina. Este método ha sido comparado con los de Smith y Bradford utilizando estándares de BSA, donde resultados analíticos prácticamente idénticos han sido informados, como se muestra en la Figura 1.5. El límite de detección de este ensayo es de 5 µg, algunas interferencias conocidas son el Triton X-100 y los compuestos fenolicos.⁹

9. K.C. Bible, S.A. Boerner y S.H. Kaufmann, *Anal. Biochem.* **267**, 1999, 217-221.

I. MÉTODOS PARA CARACTERIZAR LA MATRIZ ANALÍTICA

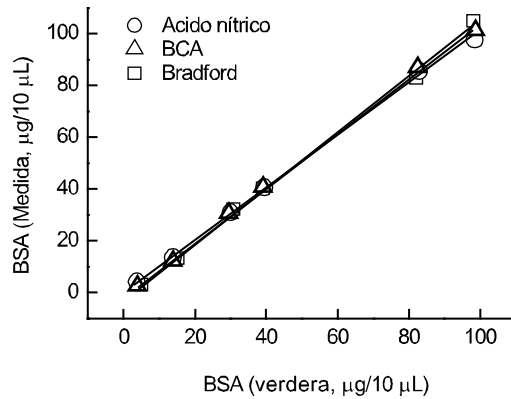
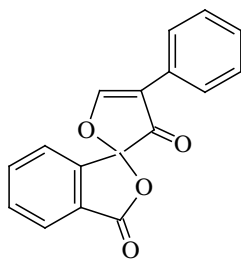


Figura 1.5. Relación entre la concentración “verdadera” y la concentración medida de BSA en seis muestras, donde se observa que el método de la nitración produce resultados comparables a los métodos de Bradford y BCA. Reproducido con permiso, K.C. Bible, S.A. Boerner and S.H. Kaufmann, *Anal. Biochem.* **267**, 1999, 217-221. “A One-Step Method for Protein Estimation in Biological Samples: Nitration of Tyrosine in Nitric Acid”. Copyright © 1999 by Academic Press.

Un método algo más antiguo empleando fluorescamina puede ser utilizado cuando se requiere mayor sensibilidad. En este método, la fluorescamina (Figura 1.6) reacciona con los grupos amino primarios de la proteína, generando fluoróforos que pueden ser excitados a 390 nm, emitiendo a 475 nm. La Figura 1.6 también muestra curvas de calibración utilizando como estándares distintas proteínas; este método es capaz de detectar cantidades tan pequeñas como 10 ng de proteína total.¹⁰



Fluorescamina

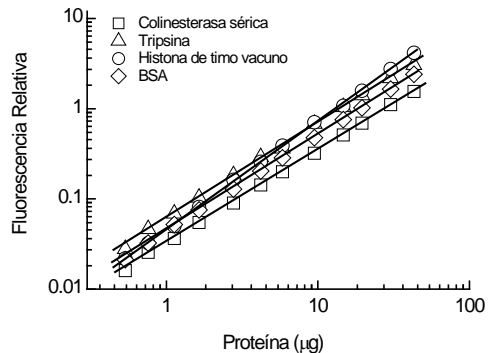


Figura 1.6. Estructura química de la fluorescamina, y curva de calibración obtenidas para diferentes proteínas. Reproducido con permiso, P. Böhlen, S. Stein, W. Dairman and S. Undenfriend, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **155**, 1973, 213-220. “Fluorometric Assay of Proteins in the Nanogram range”. Copyright © 1973 by Academic Press, Inc.

10. P. Böhlen, S. Stein, W. Dairman y S. Undenfriend, *Arch. Biochem. Biophys* **155**, 1973, 213-220.

La Tabla 1.1 compendia los límites de detección e interferencias para los métodos descritos en esta sección.

Método	Límite de detección	Interferencias
Lowry	2 µg	Acidificantes, agentes quelantes de Cu (como elevada concentración de fosfato), agentes reductores del Cu ²⁺ (como azúcares reductores, tioles), Tris, HEPES, EDTA, detergentes neutrales.
Smith	0,2 µg	Acidificantes, quelantes del Cu, agentes reductores, Tris, sulfato de amonio, EDTA, lípidos + fosfolípidos. (detergentes neutrales y SDS no interfieren).
Bradford	0,2 µg	Lípidos + fosfolípidos, detergentes neutrales, SDS.
Ninhidrina	0,02 µg	Aminoácidos libres y otros compuestos que contienen grupos amina.
Nitración	5 µg	Triton X-100, compuestos fenólicos. (Tris, SDS, urea, tioles, agentes reductores, glicerol, sulfato de amonio, detergentes neutrales no interfieren).
Fluorescamina	10 ng	Grupos amina primarios, aminas secundarias a elevadas concentraciones, TRIS, sulfato de amonio. (fosfato no interfiere).

Tabla 1.1 Límites de detección e interferencias para los métodos de estimación de proteínas totales.

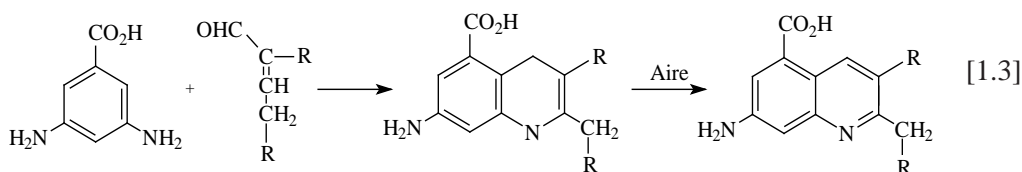
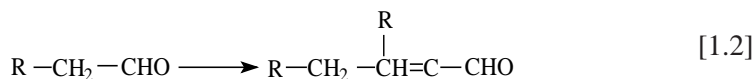
1.3 DNA total

Se encuentran disponibles varios métodos colorimétricos o fluorométricos para la determinación de DNA total. Los dos primeros que serán descriptos aquí involucran la depuración del DNA en medio ácido, seguido por reacción química con ácido 3,5-diaminobenzoico (DABA) o con difenilamina (DPA). También serán considerados dos métodos basados en la detección de fluorescencia, en los que la detección se basa en interacciones no-covalentes entre las moléculas de DNA y el reactivo.

1.3.1 Método del ácido diaminobenzoico (DABA)

Muestras conteniendo DNA son incubadas en ácido perclórico 1 N durante diez minutos; en estas condiciones, el DNA sufre depuración, desoxiribosa es liberada y transformada en

ω -hidroxilevulinialdehido. Luego, un volumen equivalente de 1,3 M DABA diclorohidrato es agregado, y la solución resultante se calienta a 60 °C por 30 minutos. En estas condiciones, las siguientes reacciones (Ecuaciones 1.2 y 1.3) ocurren:¹¹



La muestra luego se diluye 1:10 con ácido perclórico 0,6 M, midiéndose el producto de la reacción, que posee absorbancia máxima a 420 nm. El ensayo original, desarrollado por Kissane y Robins,¹² usa DABA diclorohidrato para la depurinación (no se utilizaba ácido perclórico), y se mide fluorescencia a 520 nm mientras que la muestra se excita a 420 nm. Trabajos más recientes han demostrado que el ensayo con ácido perclórico puede ser realizado en volúmenes de solo 10 μL , obteniéndose una curva de calibración en fluorescencia lineal en el rango de 10-500 ng de DNA total (1-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).¹³ Este método ha sido modificado para poder ser utilizado colorimétricamente (absorbancia a 420 nm), en los que un límite de detección de 25 μg ha sido observado.¹⁴ La reacción con DABA es específica para el DNA, pero las mediciones son afectadas por la presencia de lípidos, sacáridos, sales y el surfactante Triton X-100, algunas de estas especies pueden ser removidas de las muestras de DNA mediante precipitación con etanol.¹⁵

1.3.2 Método de la difenilamina (DPA)

Este método está basado en la medición colorimétrica de los productos formados durante la reacción de ω -hidroxilevulinialdehido (proveniente de la desoxirribosa liberada por la depurinación del DNA) con difenilamina en ácido perclórico 1 M.¹⁴⁻¹⁶ De esta reacción se obtiene una mezcla de productos, como los que se observan en la Ecuación 1.4,¹⁷ los que

11. M. Pesez y J. Bartos, "Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Organic Compounds and Drugs", Marcel Dekker, New York, 1974, pp. 284-285.

12. J.M. Kissane y E. Robins, *J. Biol. Chem.* **233**, 1958, 184-188.

13. R. Vytasek, *Anal Biochem.* **120**, 1982, 243-248.

14. F. Setaro y C.D.G. Morley, *Anal. Biochem.* **81**, 1977, 467-471.

15. P.S. Thomas y M.N. Farquhar, *Anal Biochem.* **89**, 1978, 35-44.

16. K.W. Giles y A. Meyer, *Nature* **206**, 1965, 93.

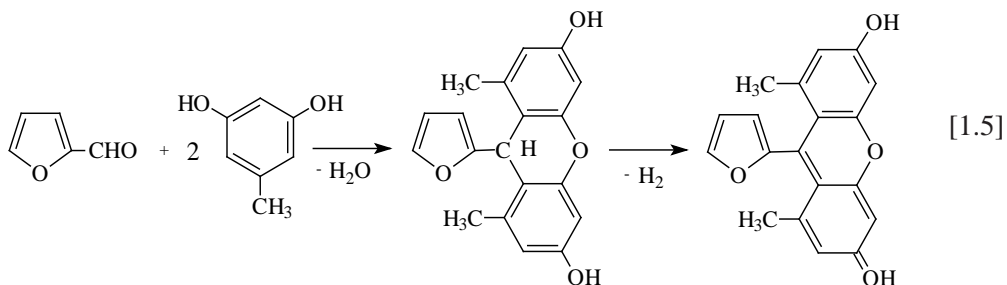
17. M. Pesez y J. Bartos, "Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Organic Compounds and Drugs", Marcel Dekker, New York, 1974, pp. 436-437.

utilizando las siguientes condiciones experimentales: Hoechst 33258 en una concentración final de 1 µg/mL en buffer fosfatos pH 7,4 (0,05 M), 2 M en NaCl.¹⁸ Es importante notar que debido a que estos métodos involucran la intercalación de un colorante entre las bases, no son útiles para la cuantificación de DNA de cadena simple.

DNA de cadena simple conteniendo residuos de desoxiguanosina pueden ser cuantificados en presencia de terbium(III). Diez micromolar Tb³⁺ en buffer cacodilato pH 6 no produce fluorescencia detectable cuando la muestra se excita a 290 nm y la emisión se mide a 488 nm. En presencia de DNA de cadena simple, el ion Tb³⁺ coordina con nucleótidos de desoxiguanosina-5-fosfato, produciendo emisión de fluorescencia en las condiciones descriptas; una relación lineal entre fluorescencia y concentración ha sido observada en el rango 1-10 µg/mL, utilizando DNA proveniente de hígado de rata desnaturalizado por calor.¹⁹

1.4 RNA total

El único método utilizado para cuantificar ácido ribonucleico es el ensayo del orcinol.²⁰ En este ensayo, el RNA es depurinado en HCl concentrado, obteniéndose ribofosfatos, los que son desfosforilados y deshidratados produciendo furfural (Ecuación 1.5). El furfural reacciona con orcinol en presencia de Fe³⁺, dando lugar a la formación de varios productos de condensación coloreados, como se muestra en la Ecuación 1.5; estos productos coloreados poseen un máximo de absorción a 660 nm.



En estas condiciones de ensayo, el DNA reacciona restringidamente, produciendo aproximadamente el 10% del color producido por la misma concentración de RNA; la deshidratación necesaria para formar furfural no ocurre fácilmente en la 2-desoxiribosa.

18. C. Labarca y K. Paigen, *Anal. Biochem.* **102**, 1980, 344-352.

19. D.P. Ringer, B.A. Howell y D. E. Kizer, *Anal. Biochem.* **103**, 1980, 337-342.

20. Z. Dische y K. Schwartz, *Mikrochim. Acta* **2**, 1937, 13-19.

El ensayo original del orcinol ha sido modificado para incrementar su selectividad hacia RNA, disminuyendo el efecto (error por exceso) producido por DNA y azúcares. El método²¹ utiliza muestras de 1,0 mL conteniendo RNA, las que son incubadas por 24 h a 40 °C con 4,0 mL de ácido sulfúrico al 85%, seguido por la adición del reactivo de orcinol (que no contiene Fe³⁺). En estas condiciones, la absorbancia se mide a 500 nm, longitud de onda en la que los productos formados por la reacción de ácido levulinico (proveniente del DNA) con orcinol no absorben. Las proteínas (por ejemplo BSA) no son interferencia, y el método es seis veces más selectivo hacia RNA (respecto a DNA) que el método del orcinol originalmente descripto.

1.5 Carbohidratos totales

Varios métodos para la cuantificación de azúcares reductores (aquellos que poseen grupos aldehído reactivos) han sido descriptos, involucrando reacciones redox con agentes oxidantes como Cu²⁺ (en presencia de BCA) o Fe(CN)₆³⁻. El reactivo de Nelson (sulfato de cobre alcalino y soluciones de molibdato y arsenato en ácido sulfúrico diluido que reducen al azul de molibdeno),²² o 2-cianoacetamida.²³ El ensayo basado en Cu²⁺-BCA ha sido descripto primeramente para la cuantificación de proteínas, es método utilizado para la cuantificación de azúcares reductores es casi idéntico al método para la determinación de proteínas totales.²⁴ Los métodos para la determinación de carbohidratos totales (reductores + no reductores) utilizan ácidos fuertes con el objetivo de hidrolizar oligosacáridos y polisacáridos, seguida de deshidratación, obteniéndose especies reactivas como el furfural. Las especies reactivas originadas pueden formar cromóforos en presencia de fenol, 2-aminotolueno²⁵ o antrona²⁶ y fluoróforos con 2-aminotiofenol. En esta sección consideraremos el método del ferricianuro para los azúcares reductores, el del fenol-ácido sulfúrico y el método del 2-aminotiofenol para carbohidratos totales, y el denominado “purpal assay” para polisacáridos bacterianos.

1.5.1 Método del ferricianuro

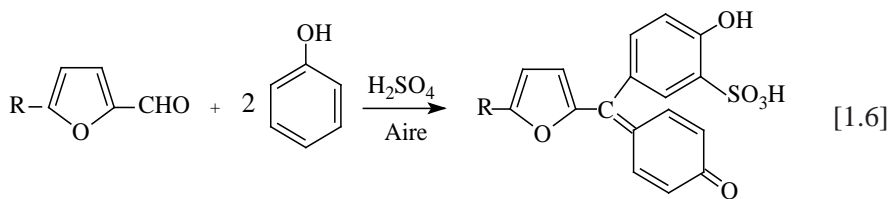
Este ensayo emplea una solución alcalina de ferricianuro de potasio (2,5 mg/mL en buffer fosfato) como único reactivo. En un protocolo típico, 80 µL de la solución conteniendo

21. R. Almog y T.L. Shirey, *Anal. Biochem.* **91**, 1978, 130-137.
22. Boyer, “*Modern Experimental Biochemistry*”, 2.^a ed., Benjamin/Cummings, New York, 1993.
23. S. Honda, Y. Nishimura, M. Takahashi, H. Chiba y K. Takehi, *Anal. Biochem.* **119**, 1982, 194-199.
24. J.D. Fox y J.F. Robyt, *Anal. Biochem.* **195**, 1991, 93-96.
25. T. Morcol y W.H. Velander, *Anal. Biochem.* **195**, 1991, 153-159.
26. M.A. Jermyn, *Anal. Biochem.* **69**, 1975, 332-335.

azúcares reductores se combinan con 20 μL de este reactivo; la mezcla resultante se calienta en un tubo sellado a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Luego de la adición de 300 μL de agua fría, se mide absorbancia a 237 nm, que es la longitud de onda de máxima absorbancia del ferrocianuro. Utilizando manosa, curvas de calibración lineales en el rango 1-25 nMolar (aproximadamente 1,3-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) han sido informadas. Residuos de triptofano y tirosina presentes en proteínas son una importante interferencia para este ensayo; el valor de esta interferencia puede ser cuantificada A_{237} luego de una incubación inicial a 40 $^{\circ}\text{C}$, temperatura a la que estos residuos reducen al ferricianuro, mientras que los azúcares reductores no reaccionan. Este método ha sido desarrollado para determinar el contenido de carbohidratos en glicoproteínas.²⁷

1.5.2 Método del Fenol / Acido Sulfúrico (Phenol-Sulfuric Acid Method)

El ácido sulfúrico concentrado hidroliza polisacáridos y oligosacáridos, liberando los monosacáridos constituyentes, los que luego de un consecuente proceso de deshidratación dan lugar a compuestos intermediarios reactivos. En presencia de fenol, estos intermediarios forman productos amarillos, como por ejemplo el que se observa en la Ecuación 1.6,²⁸ cuya mezcla posee una absorbancia máxima a 492 nm.



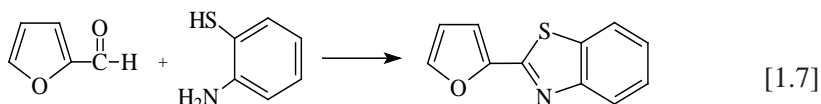
Este método ha sido adaptado para ser utilizado en un formato de placa multipozo de 96 pozos. En este formato, las muestras conteniendo carbohidrato se combinan con un volumen igual de fenol al 5% (p/v) en cada pozo de una placa, la que se coloca en un baño de hielo; luego 0,125 mL de ácido sulfúrico concentrado se agrega a cada pozo. Luego la placa se incuba (sellada para evitar excesiva evaporación) a 80 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, y luego de que se enfríe a temperatura ambiente la absorbancia en cada pozo es medida a 492 nm. Este método muestra buena linealidad para maltosa en el rango de 0,2-25 μg , utilizando un volumen de muestra de 25 μL (10-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$).²⁴

27. G. Krystal y A.F. Graham, *Anal. Biochem.* **70**, 1976, 336-345.

28. M. Pesez y J. Bartos. "Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Organic Compounds and Drugs", Marcel Dekker, New York, 1974, pp. 411-412.

1.5.3 Método del 2-Aminotiofenol

En este ensayo, furfural y otros productos relacionados que se forman por deshidratación de monosacáridos en ácidos fuertes, reaccionan con 2-aminotiofenol formando moléculas altamente fluorescentes como el 2-(2-furil)benzotiazol y especies relacionadas (Ecuación 1.7.)



La solución de reactivo contiene 0,4% (p/v) de 2-aminotiofenol; se la prepara combinando volúmenes iguales (0,34 mL) de aminotiofenol y etanol, a los que se lleva luego a un volumen de 100 mL con HCl 120 mM. Las muestras (0,5 mL) se mezclan con el reactivo (0,2 mL), y se agrega 0,5 mL de H₂SO₄ 30% luego de lo cual se sellan los viales, y se los somete a calentamiento (150 °C por 15 min.); se los deja enfriar a temperatura ambiente, y se diluyen por el agregado de 0,8 mL de agua.

La fluorescencia se mide a 411 nm, con excitación a 361 nm. Este ensayo tiene una sensibilidad muy elevada, tan poco como 50 ng de carbohidratos, como por ejemplo galactosa, glucosa y xilosa; pentosas como la arabinosa son detectables a niveles aun menores (10 ng). La mayoría de los carbohidratos estudiados producen curvas de calibración útiles en el rango de 50-600 ng (0,5-6 µg/mL).²⁹ Los surfactantes, por ejemplo SDS y Triton X-100 en concentraciones del orden de 0,5% p/v son interferencias importantes; se piensa que la alteración en la polaridad del microambiente de los fluoróforos altera consecuentemente el grado de fluorescencia. Búferes Tris y altas concentraciones de proteína (0,1 mg/mL BSA) deben ser evitados, al menos que blancos cuidadosamente preparados conteniendo la misma concentración de esas especies interferentes puedan ser preparados.

1.5.4 Método del reactivo púrpura para polisacáridos bacterianos

Los polisacáridos que contienen grupos glicol substituidos o no en residuos como por ejemplo glicerol, ribitol, arabinitol, furanosil galactosa y ácido siálico pueden ser cuantificados mediante reacción con peryodato de sodio, seguido de reacción con el reactivo púrpura (denominado Purpald reagent en la publicación original), como se muestra en la Figura 1.8. Durante la primera etapa se forma formaldehído, el que reacciona con el reactivo púrpura,

29. J.K. Zhu y E.A. Nothnagel, *Anal. Biochem.* **195**, 1991, 101-104.

siendo luego el producto de esta reacción oxidado por peryodato formando un producto púrpura, con un máximo de absorbancia a 550 nm. El límite de detección ha sido informado como 15 µg/mL utilizando polisacáridos nativos provenientes de *S. pneumoniae*.³⁰

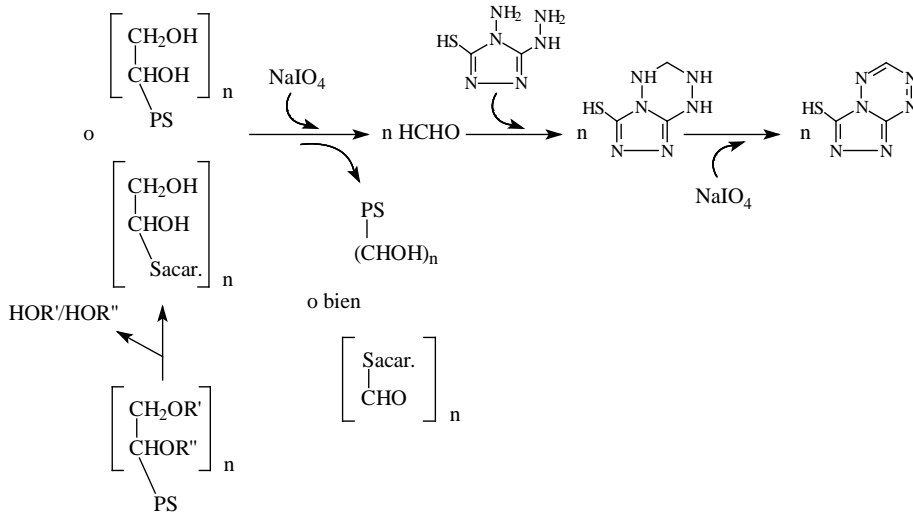


Figura 1.8. Química del ensayo púrpura para polisacáridos bacterianos (PS). Los grupos sustituyentes R' y R'' deben ser liberados durante tratamiento con NaOH y H₂SO₄, antes de la reacción con peryodato.

1.6 Ácidos grasos libres

La mayoría de los métodos para la cuantificación de ácidos grasos libres utilizan en primer lugar derivatización química, la cual es seguida por cromatografía gaseosa y espectrometría de masa (GC-MS). Sin embargo, algunos métodos colorimétricos están disponibles, uno de ellos permite cuantificar ácidos grasos libres de cadena larga (C>10) en plasma; este método está basado en el desarrollo de color al formarse jabones de cobalto en una solución de cloroformo.³¹

El ensayo utiliza cuatro soluciones: (1) cloroformo:heptano:metanol (4:3:2 en volumen), (2) 0,035 M HCl, (3) la solución salina, formada agregando de 8 mL de trietanolamina a 100 mL de una solución acuosa conteniendo 20 g Na₂SO₄, 10 g Li₂SO₄ y 4 g Co(NO₃)₂·6H₂O, y (4) la solución indicadora, consistente de 20 mg 1-nitroso-2-naftol en 100 mL de etanol al 95%.

30. Che-Hung Lee y C.E. Frasch, *Anal. Biochem.* **296**, 2001, 73-82.

31. S.W. Smith, *Anal. Biochem.* **67**, 1975, 531-539.

El protocolo descrito utiliza muestras de 100 μL que se mezclan con 4,0 mL de cloroformo:heptano:metanol y 1,0 mL 0,035 M HCl en viales sellados. Luego de mezclar y centrifugar, la fase superior (agua-metanol) es descartada, y 2,0 mL de la solución salina se agrega y mezcla vigorosamente. Una segunda etapa de centrifugación se emplea luego del agregado de 2,0 mL de la fase superior con 1,0 mL de la solución indicadora. Luego de 20 min. se mide absorbancia a 435 nm.

Curvas de calibración lineal han sido obtenidas para ácido palmítico en el rango de concentraciones 0,10-1,20 μM , con pocas sustancias interferentes. Proteínas (2% BSA) y algunos metabolitos mayoritarios como el ácido láctico o β -hidroxibutirato han sido ensayados, no produciendo interferencia en el método, mientras que concentraciones altas de fosfolípidos (como la lecitina) producen algún desarrollo de color.

1.7 Problemas

1. La concentración de proteínas totales en una muestra incógnita fue estimada utilizando los métodos de Lowry y Bradford. Los resultados obtenidos fueron $33 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ para el ensayo de Lowry y $21 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ para el ensayo de Bradford, utilizando como estándares soluciones de seroalbúmina bovina (BSA) en ambos ensayos. La muestra incógnita fue entonces oxigenada hasta su total saturación, y los ensayos repetidos. El ensayo de Lowry informó entonces $22 \pm 1 \mu\text{g/mL}$, mientras que el de Bradford repitió los valores previamente informados. ¿Porqué los resultados del ensayo de Lowry fueron menores luego de oxigenar la muestra?

2. Los ensayos de Lowry, Smith y Bradford proporcionan mas bien una estimación, y no una medición exacta de la cantidad de proteínas totales en una muestra. ¿Porqué?. ¿Cuál es la importancia de la proteína utilizada como estándar para la construcción de la curva de calibración?.

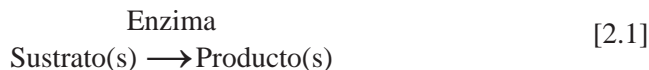
3. Un químico analítico sospecha que una muestra incógnita que contienen DNA doble cadena también contiene una cantidad significativa de carbohidratos. El ensayo DABA para DNA total informa una concentración de $44 \pm 3 \mu\text{g/mL}$, mientras que el método del ferriclanuro para carbohidratos reductores, realizado sobre la muestra diluida 10 veces, informa un resultado de $1,8 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$. El peso molecular de un residuo de DNA (desoxinucleotido monofosfato) es aproximadamente 330 g/mol, mientras que los monosacáridos tienen un peso molecular de aproximadamente 180 g/mol. Asumiendo que la interferencia en el ensayo DABA es únicamente por azúcares reductores, y que un monosacárido produce la misma absorbancia que un desoxinucleotido monofosfato en el ensayo DABA, calcule la cantidad real de DNA en la muestra incógnita. Sugiera un método más selectivo para DNA doble cadena que pudiera ser utilizado para confirmar este valor.

CAPÍTULO 2

ENZIMAS

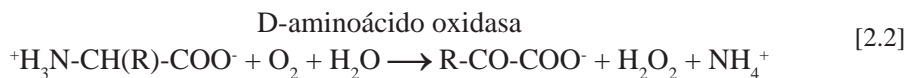
2.1 Introducción

Las enzimas son catalizadores biológicos que facilitan la conversión de sustratos en productos mediante la provisión de condiciones favorables que disminuyen la energía de activación; de esta manera la reacción progresa más rápidamente hacia el equilibrio.



Las enzimas son proteínas o glicoproteínas, y consisten al menos de una cadena polipéptida. Las regiones de la enzima directamente involucradas en la acción catalítica se llaman *sitios activos*. Una enzima puede tener asociada uno o más grupos no proteicos esenciales para la actividad catalítica, unidos al sitio activo mediante enlaces covalentes o no covalentes; cuando esto es así, la proteína o glicoproteína se llama *apoenzima*, mientras que la estructura no proteica se llama *grupo prostético*. La combinación de la apoenzima con el grupo prostético da lugar a la *holoenzima*.

La enzima D-aminoácido oxidasa, por ejemplo, cataliza la conversión de D-aminoácidos a 2-cetoácidos de acuerdo a la Ecuación 2.2:



Esta enzima es monomérica, constituida por una cadena polipéptida (apoenzima) y un grupo prostético, flavina adenina dinucleotido (FAD, Figura 2.1), unido no covalentemente con una constante de asociación¹ de $3,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. La enzima activa (holoenzima) puede ser preparada, o reconstituida, mediante la adición de FAD a la solución que contiene la apoenzima.

1. M. Husain y V. Massey, *Methods Enzymol.* **53**, 1978, 429-437

II. EZIMAS

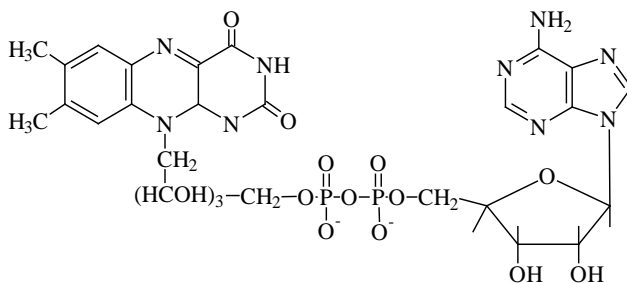


Figura 2.1. Estructura de la flavina adenina dinucleótido.

FAD es un grupo prostético redox comúnmente relacionado con los sitios activos de enzimas del grupo de las oxidasas. Una especie emparentada, la flavina mononucleotido (FMN), se encuentra relacionada con los sitios activos de muchas enzimas deshidrogenasas. Ambos grupos prostéticos tienen en común la flavina, la que es capaz de oxidarse y reducirse reversiblemente, presentando un ciclo redox en el que intercambia dos protones y dos electrones, como se muestra en la Figura 2.2.

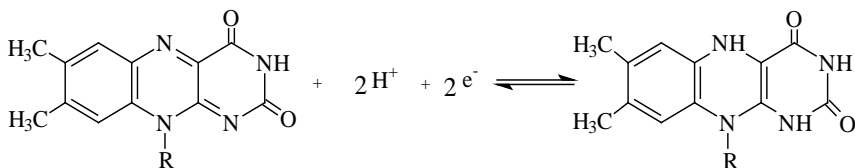
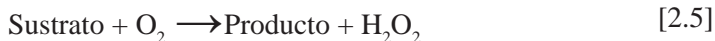
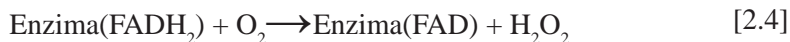


Figura 2.2. Hemireacción redox de la flavina.

El grupo prostético acepta los electrones provenientes del sustrato, electrones que son tomados por la flavina oxidada, dando lugar a flavina reducida en el sitio activo de la enzima; el producto primario difunde fuera del sitio activo, y un sustrato secundario (un aceptor de electrones), como por ejemplo oxígeno molecular, entra al sitio activo. El oxígeno acepta los electrones, regenerándose la forma oxidada de la flavina, de tal manera de completar el ciclo catalítico. Esto es representado en las Ecuaciones 2.3-2.5:



Este ciclo es típico de muchas reacciones enzimáticas, en las que luego de la conversión del sustrato sigue una etapa de regeneración de la enzima.

2.2 Nomenclatura enzimática

Los nombres de las enzimas se aplican básicamente a una sola entidad catalítica, más bien que a una serie de reacciones individualmente catalizadas. Los nombres se relacionan con la función de la enzima, principalmente al tipo de reacción catalizada. Esta convención implica que un nombre puede, de hecho, señalar una familia de las enzimas que catalizan la misma reacción, sin importar que sean levemente diferentes entre ellas. Por ejemplo, la lactato deshidrogenasa (LDH) de humanos tiene cinco de estas *isoenzimas*. La LDH cataliza la oxidación del ácido L-láctico por la nicotinamina adenina dinucleótido (NAD⁺), un *cofactor* común para las deshidrogenasas, como se muestra en la Eq. 2.6 y la Figura 2.3.

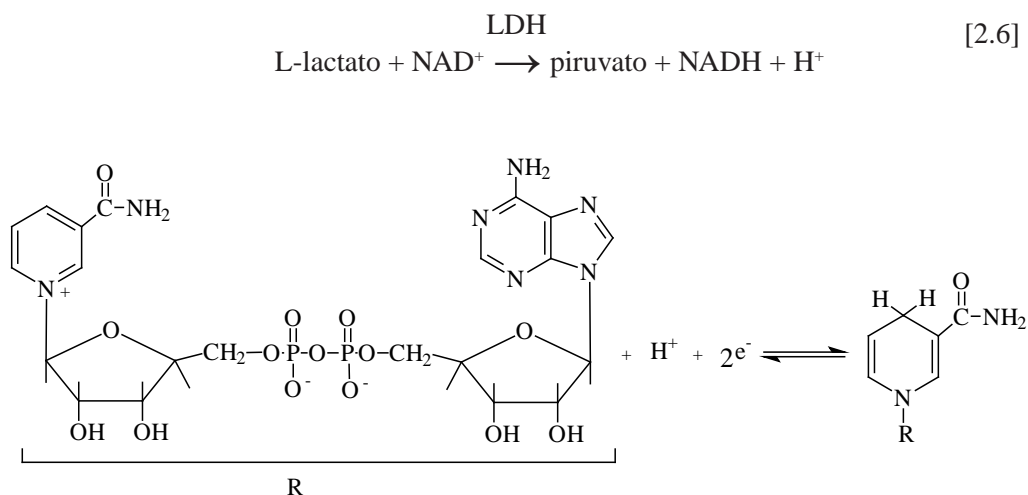


Figure 2.3. Hemireacción redox de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺).

Mientras que cada una de las cinco isoenzimas de la LDH cataliza la conversión del ácido láctico al ácido pirúvico, las diferentes isoenzimas se producen en diversos órganos. Las cadenas polipéptidas de estas enzimas son levemente diferentes, y debido a esto la velocidad de conversión de lactato en piruvato es levemente diferente para cada isoenzima. Del mismo modo, diversas especies biológicas poseen a menudo caminos metabólicos idénticos, en los que funcionan enzimas equivalentes pero levemente distintas capaces de catalizar las mismas reacciones químicas. Las diferencias que ocurren dentro de tal familia de enzimas ocurren generalmente en las regiones no críticas de la cadena polipeptídica, como por ejemplo la sustitución de un residuo aminoácido por otro, o por la eliminación de algunos residuos del polipéptido.

2.3 Clasificación de las enzimas²

La identificación de una enzima particular es posible mediante el sistema numérico establecido por la Comisión de Enzimas (Enzyme Comision, E.C.). La numeración asignada se describe en pautas precisadas por la Unión Internacional de la Bioquímica (International Union of Biochemistry), y sigue el formato **E.C. w.x.y.z**, donde valores numéricos substituyen los índices **w**, **x**, **y** y **z**. El valor de **w** está siempre entre uno y seis, e indica una de seis divisiones principales; los valores de **x** indican la subclasificación, y se relacionan a menudo con el grupo prostético o el cofactor requerido para la reacción; los valores de **y** indican una sub-subclasificación, relacionada a un sustrato o a una familia de productos; por último, el valor de **z** indica el número de serie asignado a la enzima.

Las seis divisiones principales son (1) las oxidoreductasas, (2) las transferasas, (3) las hidrolasas, (4) las liasas, (5) las isomerasas, y (6) las ligasas (sintetasas). Todas las enzimas conocidas caen en una de estas seis categorías. Las oxidoreductasas catalizan la transferencia de electrones y protones desde un donante a un aceptor. Las transferasas catalizan la transferencia de un grupo funcional de un donante a un aceptor. Las hidrolasas facilitan la ruptura de enlaces C-C, C-O, C-N y de otros enlaces por el agua. Las liasas catalizan la ruptura de estos mismos enlaces mediante su eliminación, dejando dobles enlaces (o, en el modo reverso, cataliza la adición de grupos sobre dobles enlaces). Las isomerasas facilitan las reorientaciones geométricas o de posición, generando diferentes isómeros. Finalmente, las ligasas catalizan la unión de dos moléculas, y requieren a menudo la hidrólisis de un enlace de algún cofactor que provea la energía necesaria para el paso sintético, como por la adenosina trifosfato (ATP, Figura 2.4).

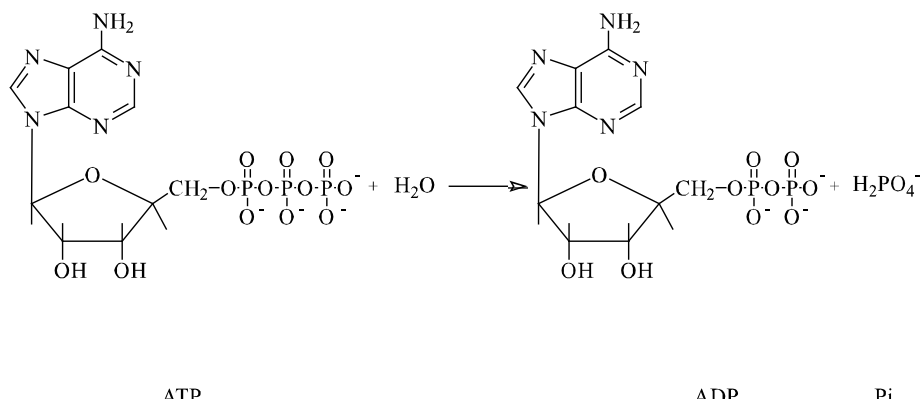
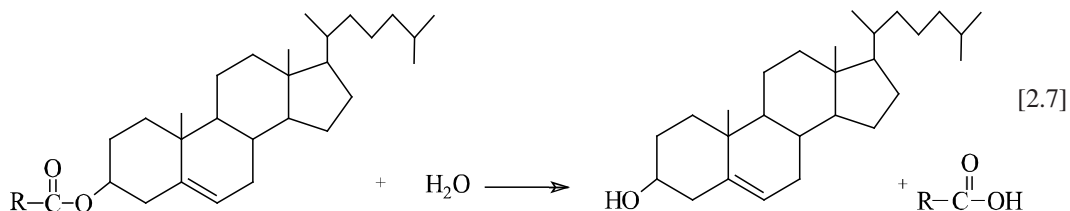


Figure 2.4. Hidrólisis de adenosina trifosfato a adenosina difosfato y fósforo inorgánico.

2. International Union of Biochemistry and Molecular Biology "Enzyme Nomenclature 1992", Academic Press, Orlando, 1992.

Las enzimas D-aminoácido oxidasa y lactato deshidrogenasa (Ecuaciones 2.2 y 2.6) tienen los números de la Comisión de Enzimas E.C 1.4.3.3 y E.C. 1.1.1.28, respectivamente; ambas son oxidoreductasas y por lo tanto están incluidas en la primera de las seis divisiones principales. La enzima colesterol esterase cataliza la hidrólisis de los ésteres del colesterol, obteniéndose como producto colesterol y los ácidos grasos libres (Ecuación 2.7), y ha sido identificada como E.C. 3.1.1.13.



Además del número de asignado por la Comisión de Enzimas, la fuente de cada enzima en particular es generalmente un dato importante, informando la especie biológica y el órgano específico del que la enzima ha sido obtenida.

2.4 Enzimas en Química Bioanalítica

Las enzimas se pueden emplear para medir concentraciones de sustrato así como las concentraciones de las especies que afectan la actividad catalítica de la enzima hacia su sustrato, tal como activadores e inhibidores. El primer análisis enzimático del que se tiene registro fue anunciado por Osann en 1845: peróxido de hidrógeno fue cuantificado usando la enzima peroxidasa. En 1851, Schönbein informó un límite de detección para peróxido de hidrógeno de 1 parte en 2×10^6 (es decir, ¡500 ppb!) utilizando este método. Los métodos enzimáticos son populares porque son relativamente simples, las muestras requieren poco o ningún tratamiento previo, y no requieren de instrumentación costosa. Sin embargo, la ventaja más importante es la carencia de interferencias debido a la selectividad de las enzimas para sus sustratos naturales.

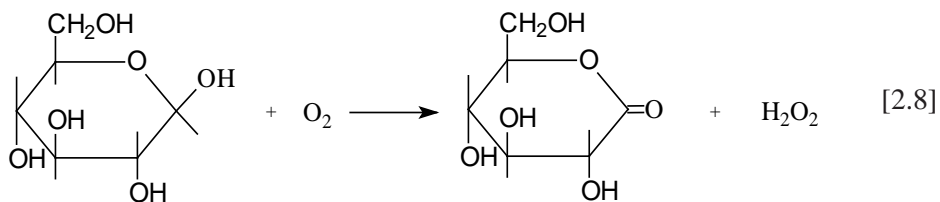
La selectividad de la glucosa oxidasa (E.C. 1.1.3.4) proveniente de *Aspergillus niger* se ha estudiado comparando su actividad enzimática (velocidad de formación de producto) respecto a una variedad de azúcares estructuralmente relacionados; como puede observarse en la Tabla 2.1.³ La reactividad es máxima respecto al sustrato natural de esta enzima, la β -D-glucosa (Eq. 2.8), por lo que a la oxidación de este sustrato se le ha asignado una la velocidad relativa de oxidación del 100%.

3. M. Dixon, y E.C. Webb, "Enzymes", 3^{ra} Ed., Academic Press, New York, 1979. p. 243.

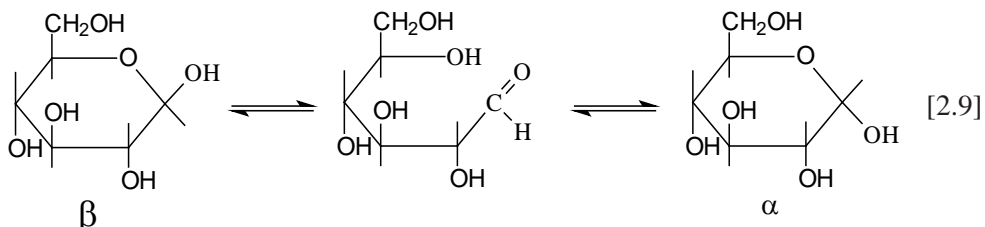
II. EZIMAS

Sustrato	Velocidad relativa de oxidación (%)
β -D-Glucosa	100
2-Deoxy-D-glucosa	25
6-Deoxy-6-fluoro-D-glucosa	3
6-Metil-D-glucosa	1,85
4,6-Dimetil-D-glucosa	1,22
D-Manosa	0,98
D-Xilosa	0,98
α -D-Glucosa	0,22

Tabla 2.1. Selectividad para el sustrato de la glucosa oxidasa.³ Reproducida, con permiso, de M. Dixon, y E.C. Webb, "Enzymes", 3rd Ed., Academic Press, New York, 1979. p. 243. Third edition © Longman Group Ltd. 1979.



Los datos en la Tabla 2.1 demuestran que el único sustrato que representaría una interferencia significativa en un análisis enzimático para la glucosa usando la glucosa oxidasa es la 2-deoxi-D-glucosa. Es de interés particular el hecho de que la forma anomérica del sustrato natural de la enzima, α -D-glucosa, no puede ser oxidada a una velocidad significativa, aunque los dos compuestos se diferencian solamente en la posición del grupo del oxidrilo en la posición C1 del azúcar (Eq. 2.9). Esta selectividad exquisita es la que se explota en análisis enzimáticos, permitiendo su uso para la cuantificación del sustrato en matrices que pueden ser tan complejas como la sangre o los medios de cultivo.



Para entender cómo las enzimas se utilizan en los métodos bioanalíticos, y cómo sus concentraciones son determinadas y representadas, es necesario primero examinar la cinética de reacciones enzimáticas que emplean un único sustrato, y aquellas que utilizan dos sustratos.

2.5 Cinética enzimática

Aumentos dramáticos en las velocidades de reacción cuando estas son catalizadas por una enzima pueden observarse en la Tabla 2.2.⁴, en la que algunas reacciones típicas han sido listadas. La hidrólisis de una amida como la benzamida por tratamiento con ácido o base produce una cinética de segundo orden, con una constante de velocidad unos 6 ordenes de magnitud menor que la obtenida cuando la enzima α -quimotripsina cataliza la conversión de benzoil-L-tirosinamida (benzoyl-L-tyrosinamide). Aún más dramático es el cambio de velocidad que se observa para la hidrólisis de urea: la hidrólisis catalizada por tratamiento ácido es casi *trece órdenes de magnitud* más lenta que la hidrólisis con la enzima ureasa. La desprotonación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular es acelerada por un factor de cerca de un millón en presencia de catalasa.

Sustrato	Agente Catalítico	$T/^{\circ}K$	$k, M^{-1}s^{-1}$
Amida (hidrólisis)			
-Benzamida	H^+	325	$2,4 \times 10^{-6}$
-Benzamida	OH^-	326	$8,5 \times 10^{-6}$
-Benzoil-L-tirosinamida	α -Quimotripsina	298	14,9
Urea (hidrólisis)	H^+	335	$7,4 \times 10^{-7}$
	Ureasa	294	$5,0 \times 10^6$
Peróxido de hidrógeno	Fe^{2+}	295	56
	Catalasa	295	$3,5 \times 10^7$

Tabla 2.2. Ejemplos del poder catalítico de las enzimas.⁴ Reproducida, con permiso, de N.C. Price y L. Stevens, “*Fundamentals of Enzymology*” 2nd Ed. Oxford University Press, 1989. © N.C. Price and L. Stevens, 1989.

La selectividad y el aumento de la velocidad de reacción que acompaña la acción de las enzimas se relacionan con la formación de complejos enzima-sustrato. Esta formación del complejo da lugar a un estado de la transición para la reacción, de que baja ΔG^\ddagger , la energía de activación, pero no afecta la energía libre neta para la conversión del sustrato en producto. Esto se representa en la Figura 2.5, para la reacción simple de conversión de un sustrato que se observa en la Eq. 2.10:



donde E es la enzima, S es el sustrato, $E \bullet S$ es el complejo enzima-sustrato, y P es el producto e la reacción.

4. N.C. Price y L. Stevens, “*Fundamentals of Enzymology*”, 2^{da} Ed., Oxford Science Publishers, London, 1989. p. 4.

II. EZIMAS

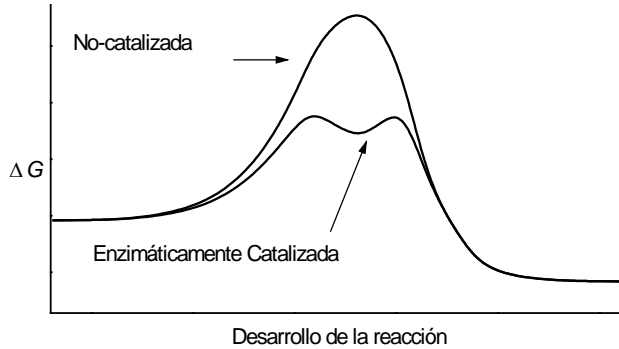


Figura 2.5. Perfiles de energía libre durante reacciones no catalizadas y catalizadas enzimáticamente.

El primer paso crítico en reacciones catalizadas enzimáticamente es la formación del complejo $E \bullet S$, que se representa generalmente como una simple reacción de asociación, como se muestra en la Eq. 2.10. Debido a que el complejo $E \bullet S$ es el reactivo para el paso de conversión de sustrato, su concentración limita la velocidad de la reacción, la que alcanzara el máximo cuando toda la enzima disponible exista en la forma de complejo de $E \bullet S$. Esta situación ocurre cuando la concentración del sustrato es suficientemente alta, situación en la que se dice que la enzima se encuentra *saturada* con sustrato. Si la concentración de la enzima se mantiene constante, un grafico de la velocidad inicial de reacción versus la concentración inicial de sustrato (Figura 2.6) rendirá una curva típica de cinética de saturación, donde una meseta (plateau) se observa a elevadas $[S]$.

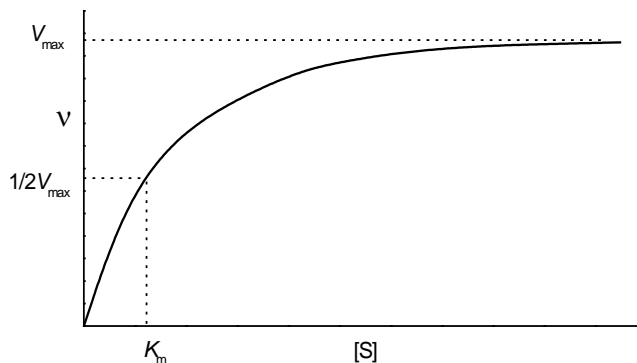
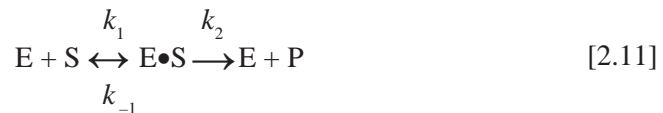


Figura 2.6. Velocidad inicial de reacción (v) versus concentración de sustrato ($[S]$) para una reacción catalizada enzimáticamente, en la que la concentración de enzima es constante.

El diagrama de la Fig. 2.6 tiene dos regiones que son importantes en los métodos analíticos. Primero, cuando [S] es muy baja, la velocidad de reacción se relaciona en forma lineal con [S]; bajo estas condiciones de cinética de primer orden, las velocidades de reacción pueden ser utilizadas para cuantificar el sustrato. La segunda región de interés ocurre a muy altas [S], en donde la velocidad de reacción es independiente de la [S]; bajo estas condiciones de cinética de orden cero, toda la enzima disponible existe como complejo E•S, y la velocidad de reacción puede ser utilizada para determinar la cantidad total de enzima presente en la muestra.

2.5.1 Cinética enzimática de enzimas que utilizan un único sustrato

Este tipo de cinética se aplica a muchas reacciones enzimáticas que requieran el agua como cosustrato, es decir las hidrolasas (tales como esterasas y proteasas), puesto que las soluciones acuosas tienen una concentración del agua de 55,6 M. El modelo cinético se basa en la formación inicial del complejo enzima-sustrato, con las constantes de velocidad según se muestran abajo:



De este modelo, la constante de la disociación del complejo enzima-sustrato, K_d , será igual a k_{-1}/k_1 , por lo tanto igual a $[E][S]/[E \bullet S]$.

La derivación matemática de la expresión para la velocidad de reacción se basa en las velocidades iniciales de reacción. Asumiremos que, casi inmediatamente después de la reacción comienza, la velocidad a la que cambia la concentración del complejo enzima-sustrato es igual a cero, esto es, se alcanza el estado de equilibrio para $[E \bullet S]$. La velocidad de cambio de $[E \bullet S]$ con el tiempo, $d[E \bullet S]/dt$, puede ser expresado como en la Eq. 2.12:

$$d[E \bullet S]/dt = k_1[E][S] - k_{-1}[E \bullet S] - k_2[E \bullet S] = 0, \quad [2.12]$$

donde $[E \bullet S]$ se forma solamente de la reacción de la asociación, pero es removido por la disociación en E y S, o por la conversión en producto.

La enzima existe en solución como E o E•S, de modo que en cualquier momento, la concentración total de la enzima es igual a la suma de estas concentraciones, o $[E]_0 = [E] + [E \bullet S]$. Si esta expresión se utiliza para sustituir a [E] en la Eq. 2.12, se obtiene:

$$d[E \bullet S]/dt = k_1([E]_0 - [E \bullet S]) \times [S] - k_{-1}[E \bullet S] - k_2[E \bullet S] = 0. \quad [2.13]$$

II. EZIMAS

Reordenado y despejando $[E \bullet S]$ se obtienen las Eqs. 2.14 y 2.15:

$$k_1[E]_o[S] - (k_1[S] + k_{-1} + k_2) \times [E \bullet S] = 0, \quad [2.14]$$

$$[E \bullet S] = [E]_o[S] / \{ [S] + (k_{-1} + k_2)/k_1 \}. \quad [2.15]$$

Ahora, la Eq. 2.15 puede ser utilizada para encontrar la velocidad inicial de formación de producto, como se presenta en la Eq. 2.16:

$$\begin{aligned} v &= k_2[E \bullet S] \\ &= k_2[E]_o[S] / \{ [S] + (k_{-1} + k_2)/k_1 \}. \end{aligned} \quad [2.16]$$

Si recordamos que la velocidad máxima de reacción, V_{\max} , ocurre cuando toda la enzima disponible se encuentra como complejo enzima-sustrato, (es decir, $[E \bullet S] = [E]_o$), el término V_{\max} puede ser substituido por $k_2[E]_o$; además, la constante K_m se utiliza para representar $(k_{-1} + k_2)/k_1$, de tal manera que la Eq. 2.16 se simplifica dando lugar a la forma estándar de la ecuación de *Michaelis-Menten* (Eq. 2.17):

$$v = V_{\max} [S] / (K_m + [S]). \quad [2.17]$$

Debe notarse que la constante de Michaelis-Menten, K_m , esta relacionada con la constante de disociación del complejo enzima-sustrato, K_d ; de hecho, K_m debe ser siempre mayor que K_d , pero debe aproximarse a K_d cuando k_2 se acerca a cero. También es útil notar que cuando $[S] = K_m$, $v = V_{\max}/2$; en otras palabras, la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima cuando la concentración de sustrato es igual a K_m .

Hay dos simplificaciones de la ecuación de Michaelis-Menten que son de enorme importancia analítica. La primera ocurre a baja concentración de sustrato: si $[S] \ll K_m$, entonces $K_m + [S] \approx K_m$. Bajo estas condiciones, la Eq. 2.17 se simplifica dando lugar a la Eq. 2.18:

$$v = V_{\max} [S] / K_m = \text{Constante} \times [S]. \quad [2.18]$$

La velocidad inicial de reacción es por lo tanto directamente proporcional a la concentración inicial del sustrato a baja $[S]$, y se puede utilizar para cuantificar el sustrato. Esto se observa en la región lineal inicial del diagrama del grafico de velocidad inicial versus concentración de sustrato, Figura 2.6, donde la pendiente de esta región es igual a V_{\max}/K_m .

La segunda simplificación de la Eq. 2.17 ocurre a elevada concentración de sustrato. Si la concentración de sustrato es muy superior al K_m , entonces $[S]/(K_m + [S]) \approx 1$ and $v \approx V_{\max}$. Bajo estas condiciones,

$$v = V_{\max} = k_2[E]_o. \quad [2.19]$$

La velocidad inicial de la reacción ahora es independiente de $[S]$, según puede observarse en la región de la meseta de la Figura 2.6. La velocidad en esta situación depende linealmente de la concentración de enzima, y un diagrama de la velocidad inicial respecto la concentración total de enzima tendrá una pendiente de k_2 . Así, a elevada concentración de sustrato, la velocidad inicial de la reacción puede ser utilizada para la determinación de la concentración de enzima.

En la práctica, la Eq. 2.18 puede ser utilizada si $[S] < 0.1K_m$, mientras que la Eq. 2.19 es útil si $[S] > 10K_m$. Debe recordarse que al utilizar estas expresiones se asume que se alcanza un estado de equilibrio, solo son válidas si $[S] \gg [E]_0$, y en la práctica, concentraciones de sustrato en exceso de $10^3[E]_0$ son habitualmente usadas.

2.5.2 Determinación experimental de los parámetros de Michaelis-Menten

Teniendo en cuenta el gráfico de velocidad versus concentración, dos regiones de utilidad analítica pueden ser notadas, como se muestra en las Ecuaciones 2.18 y 2.19, regiones que ocurren a $[S] < 0.1K_m$, (para la cuantificación del sustrato) y a $[S] > 10K_m$ (para la cuantificación de la enzima). En el desarrollo de un nuevo método de análisis, o al adaptar un análisis establecido a nuevas condiciones, es importante establecer el K_m de la enzima. Es también de importancia práctica establecer y ajustar la V_{max} , para obtener la precisión deseada para el análisis en el mínimo tiempo posible.

Cuatro métodos gráficos se pueden utilizar para establecer los valores de K_m y V_{max} bajo dadas condiciones experimentales, conocidos como los métodos de *Eadie-Hofstee*, *Hanes*, *Lineweaver-Burk* and *Cornish-Bowden-Eisenthal*. Los cuatro implican la medida de las velocidades iniciales de reacción como función de la concentración inicial de sustrato, a dada concentración enzimática constante.

2.5.2.1 Método de Eadie-Hofstee ^{5,6}.

La ecuación de Michaelis-Menten (Eq. 2.17) puede ser reordenada algebraicamente, de tal manera de obtener la Eq. 2.20, como se muestra:

$$v = V_{max} - K_m(v/[S]) . \quad [2.20]$$

Un gráfico de v (como y) versus $v/[S]$ (como x) puede proporcionar, luego de someterlo a una regresión lineal, el valor de V_{max} (intersección en el eje y) y el valor de $-K_m$ (pendiente), como se observa en la Figura 2.7. Este es el método de “regresión lineal” preferido para la

5. G.S. Eadie, *J. Biol. Chem.* **146**, 1942, 85-93.

6. B.H.J. Hofstee, *Science* **116**, 1952, 329-331.

II. EZIMAS

determinación de K_m y V_{max} , dado que su precisión y exactitud es algo mejor que la obtenida mediante el gráfico de Hanes, y bastante mejor que aquella obtenida utilizando el método de Lineweaver-Burk.

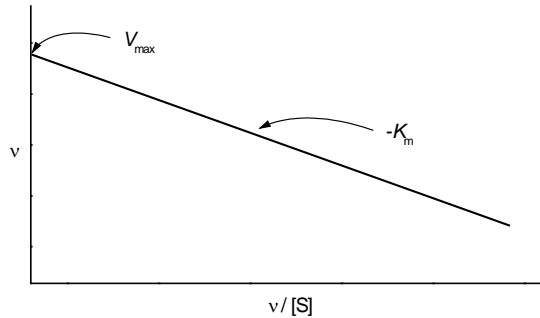


Figura 2.7. Gráfico de Eadie-Hofstee para mediciones de v como una función de $[S]$.

2.5.2.2 Método de Hanes⁷.

Un reordenamiento distinto de la ecuación de Michaelis-Menten rinde la forma que se utiliza en el método de Hanes:

$$[S]/v = K_m/V_{max} + [S]/V_{max} \quad [2.21]$$

Utilizando el método de Hanes (Figura 2.8), $[S]/v$ (como y) es graficado versus $[S]$, dando lugar luego de aplicar regresión lineal una recta de pendiente igual a $1/V_{max}$, cortando al eje y en K_m/V_{max} . El K_m luego se calcula como la ordenada de origen sobre la pendiente.

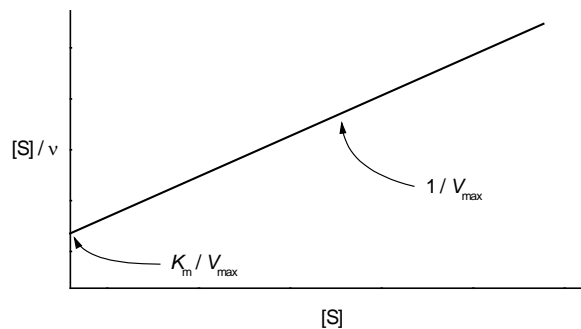


Figura 2.8. Gráfico de Hanes para mediciones de v como una función de $[S]$.

7. C.S. Hanes, *Biochem. J.* **26**, 1932, 1406-1421.

2.5.2.3 Método de Lineweaver-Burk⁸.

La Ecuación de Michaelis-Menten puede ser reordenada algebraicamente, obteniéndose la Ecuación 2.22, dando lugar a un tercer tipo de gráfico lineal, llamado gráfico de Lineweaver-Burk o gráfico de doble recíproca:

$$1/v = 1/V_{\max} + K_m/(V_{\max} \times [S]) . \quad [2.22]$$

La inversa de la velocidad $1/v$ es graficada respecto a la inversa de la concentración de sustrato $1/[S]$, obteniéndose una línea recta con una pendiente positiva igual a K_m/V_{\max} y una ordenada de origen igual a $1/V_{\max}$. Luego, el valor de K_m se calcula utilizando los valores de regresión lineal de la pendiente dividida por la ordenada de origen (Figura 2.9). Mientras que el diagrama de Lineweaver-Burk es posiblemente el método gráfico más comúnmente utilizado para la determinación de los parámetros de Michaelis-Menten, con el se obtienen los valores más pobres en cuanto a exactitud y precisión. La razón principal de esto es que, puesto que es un diagrama recíproco, los valores más pequeños de $[S]$ y v dan lugar a los valores numéricos más grandes del diagrama. Estos valores pequeños tienen mayor imprecisión relativa, mientras que todos los programas estándares que realizan regresión lineal asumen una incertidumbre constante en todos los valores de la ordenada (y, $1/v$) graficados. Una estrategia para reducir al mínimo este problema utiliza la regresión lineal “pesada” (weighted linear regression), donde estos puntos imprecisos obtenidos en concentraciones más bajas son considerados con menos valor para el cálculo de la pendiente y la ordenada de origen. La popularidad del diagrama de Lineweaver-Burk resulta de su uso como diagrama de diagnóstico para los inhibidores enzimáticos, tema que será discutido en la sección 2.7.

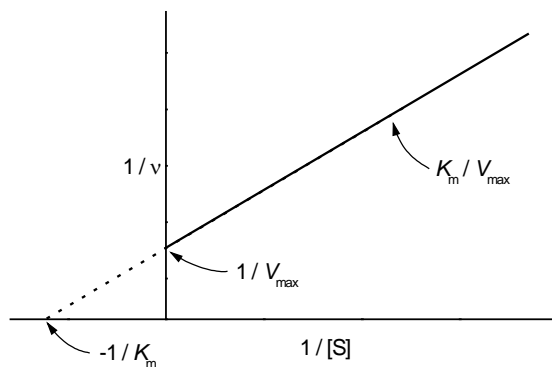


Figura 2.9. Gráfico de Lineweaver-Burk para mediciones de v como una función de $[S]$.

8. H. Lineweaver y D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 1934, 658-666.

2.5.2.4 Método de Cornish-Bowden-Eisenthal⁹.

Este método es distinto a los tres métodos de regresión lineal anteriores; aquí, cada par de valores (v , $[S]$) se utilizan para construir una recta separada, en la que V_{\max} y K_m forman los ejes y y x de la regresión, respectivamente. Se utiliza otra versión de la ecuación de Michaelis-Menten, en la que V_{\max} es el valor de y y K_m es el valor de x , como se muestra abajo:

$$V_{\max} = v + (v/[S]) \times K_m. \quad [2.23]$$

Puede observarse que para cada punto (v , $[S]$), se obtendrá una única pendiente ($v/[S]$) y ordenada de origen (v). Estos valores definen una única recta en el gráfico de V_{\max} versus K_m . Cada par ($v/[S]$) define una recta distinta, que en ausencia de incertidumbre experimental *se intersectarán en un único punto que define la V_{\max} y el K_m para la enzima estudiada*. Este tipo de gráfico se muestra en la Figura 2.10.

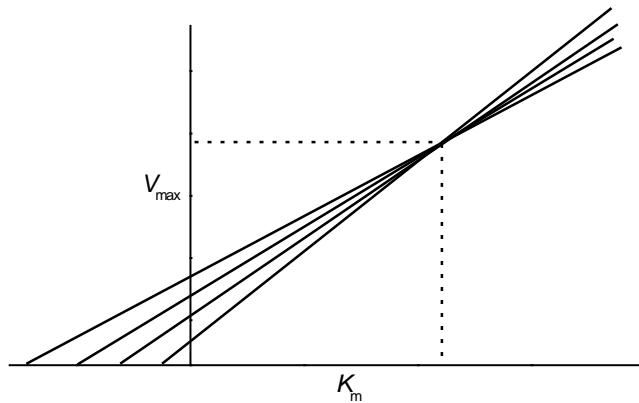


Figura 2.10. Gráfico de Cornish-Bowden-Eisenthal obtenido para cuatro (v , $[S]$) pares de datos.

En la práctica, estas rectas no pasan a través de un único punto según lo demostrado en Fig. 2.10, sino que por el contrario se observa un racimo de puntos en la región de la intersección. Todos los puntos de la intersección entonces se utilizan para calcular los valores promedio de K_m y V_{\max} . Este método inusual se ha demostrado que produce la mejor exactitud y precisión para series de datos tratados estadísticamente.

2.5.3 Comparación de métodos para la determinación del K_m ¹⁰

La precisión y exactitud de los cuatro métodos descritos previamente para la determinación del valor de K_m fueron comparadas estadísticamente, generando primero una serie

9. A. Cornish-Bowden y R. Eisenthal, *Biochem. J.* **139**, 1974, 721-730.

de datos “ideales” (sin error) de v y $[S]$, y luego introduciendo diversos tipos de error a los valores de v para generar un total de cien series individuales de datos. La serie de datos ideales fue generado utilizando la Eq. 2.17 con $V_{\max} = K_m = 1$, los siete valores individuales se presentan en la Tabla 2.3.

[S]	v
0,25	0,200
0,50	0,333
0,75	0,428
1,00	0,500
1,25	0,556
1,50	0,600
1,75	0,636

Tabla 2.3. Datos libres de error (modelo de Michaelis-Menten) para comparar los distintos métodos de estimación.

Cincuenta series de datos que contenían errores absolutos fueron generados agregando números al azar con una media de cero y una desviación estándar de 0,05 a cada valor de v . Otras cincuenta series de datos fueron generados para contener errores relativos, multiplicando cada valor de v por un número al azar con una media igual a uno y una desviación estándar de 0,10. Estas cien series de datos fueron analizados individualmente por cada uno de los cuatro métodos, generando cien valores de K_m para cada método. El valor promedio del K_m y su incertidumbre, para cada método y tipo de error, se resumen en la Tabla 2.4.

Método	Tipo de error	
	Absoluto	Relativo
Lineweaver-Burk ($1/v$ vs $1/[S]$)	$1,13 \pm 0,82$	$1,09 \pm 0,43$
Hanes ($[S]/v$ vs $[S]$)	$1,05 \pm 0,46$	$1,05 \pm 0,33$
Eadie-Hofstee (v vs $v/[S]$)	$0,93 \pm 0,46$	$0,88 \pm 0,31$
Cornish-Bowden-Eisenthal (V_{\max} vs K_m)	$0,79 \pm 0,31$	$0,94 \pm 0,29$

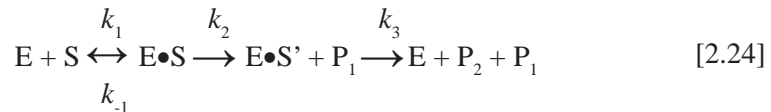
Tabla 2.4. Estimaciones del K_m (valor verdadero = 1,00) para datos con diferentes tipos de errores.

II. EZIMAS

Los resultados resumidos en la Tabla 2.4 muestran que mientras que los cuatro métodos proporcionan valores de K_m con buena exactitud (en todos los casos, $K_m = 1,00$, con las incertidumbres informadas), el método de Lineweaver-Burk produce resultados de una precisión relativamente menor que cualquiera de los otros tres métodos. El método de Cornish-Bowden-Eisenthal claramente produce los valores más precisos de K_m , tanto en presencia de errores absolutos o relativos.

2.5.4 Cinética de enzimas con un sustrato y dos productos

Las enzimas hidrolíticas que liberan dos productos en una secuencia definida requieren un modelo algo más complicado para explicar su comportamiento cinético. Estas enzimas pasan a través de dos complejos intermediarios en su ciclo catalítico, $E \bullet S$ y $E \bullet S'$, y la formación de productos implica dos pasos con las constantes de velocidad asociadas, k_2 y k_3 :



El paso que limita la velocidad se asume que involucra la liberación del primer producto P_1 y la conversión de $E \bullet S$ en $E \bullet S'$. La aplicación de la aproximación al estado de equilibrio a ambos $[E \bullet S]$ y $[E \bullet S']$ (esto es, asumiendo que $d[E \bullet S]/dt = 0$ y $d[E \bullet S']/dt = 0$) produce la Eq. 2.25 para la velocidad de reacción, luego de pasos análogos a los observados en las Eqs. 2.12-2.16:

$$v = k_2[E \bullet S] = \frac{\{k_2 k_3 / (k_2 + k_3)\} \times [E]_o \times [S]}{\{(k_{-1} + k_2) / k_2\} \times \{k_3 / (k_2 + k_3)\} + [S]} \quad [2.25]$$

Mientras que la Eq. 2.25 parece mucho más complicada, tiene la misma forma que la Eq. 2.17. De hecho, si las siguientes substituciones, $V_{\max} = k_{\text{cat}}[E]_o = \{k_2 k_3 / (k_2 + k_3)\}[E]_o$, y $K_m = \{(k_{-1} + k_2) / k_2\} \{k_3 / (k_2 + k_3)\}$ son realizadas, se obtiene la Eq. 2.17; en este tipo de enzimas se observa que presentan una cinética de Michaelis-Menten

2.5.5 Cinética enzimática de enzimas que utilizan dos sustratos

Cuando más de un sustrato es utilizado en una reacción enzimática, el comportamiento cinético de esta no puede ser descripto utilizando la ecuación de Michaelis-Menten. Este es el caso para las oxidoreductasas, las transferasas y las ligasas, tres de las seis divisiones

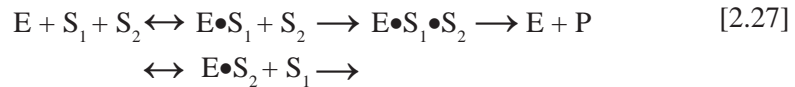
principales de enzimas. El comportamiento cinético de estos sistemas es necesariamente más complicado, y depende de la formación o no de un complejo ternario compuesto por la enzima, el sustrato primario y el sustrato secundario.

Si se forma un complejo ternario, el mecanismo se puede considerar ordenado o al azar. El mecanismo ordenado requiere que el primer sustrato (S_1) debe unirse a la enzima antes de que el segundo sustrato (S_2) se una, proceso que se representa mediante la Eq. 2.26:



Las deshidrogenasas que utilizan NAD^+ como cofactor siguen este mecanismo, dado que un complejo enzima- NAD^+ se forma inicialmente, que cambia localmente la estructura del sitio activo de la enzima para permitir la unión del sustrato.

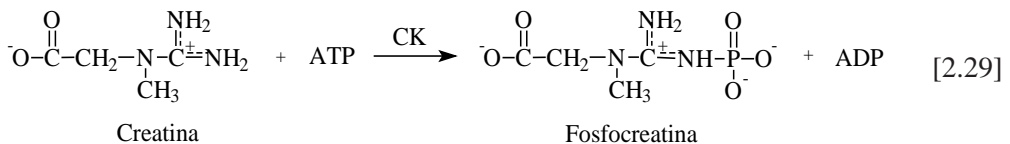
Si no se requiere ningún orden en particular para la unión de los sustratos, se utiliza el modelo que se muestra en la Eq. 2.27:



En este caso, cualquier sustrato se unirá a la enzima inicialmente, dando como resultado final un complejo ternario que luego se descompondrá en productos. Si se asume que tres complejos, $E \bullet S_1$, $E \bullet S_2$ y $E \bullet S_1 \bullet S_2$ se forman rápidamente, y que la transformación de $E \bullet S_1 \bullet S_2$ en productos es relativamente lenta (y limitante de la velocidad), obtenemos la Eq. 2.28 para la velocidad inicial de reacción:

$$v = V_{\max} / \{ 1 + K_{m1}/[S_1] + K_{m2}/[S_2] + K_{m12}/([S_1] \times [S_2]) \} . \quad [2.28]$$

La Eq. 2.28 contiene un nuevo término, K_{m12} , que representa un cambio en la afinidad de la enzima para el segundo sustrato, una vez que el primer sustrato se encuentra unido a la enzima. Si el mecanismo es ordenado, la simple relación $K_{m12} = K_{m1} \times K_{m2}$ puede ser aplicada. Para un mecanismo al azar, el valor de K_{m12} se determina experimentalmente. La creatinina quinasa (CK, ver abajo) es un ejemplo de este tipo de enzima. La creatinina y el ATP se unen a la enzima aleatoriamente en sitios de unión cercanos pero independientes.



II. EZIMAS

Si el mecanismo para la utilización de los dos sustratos no implica la formación de un complejo ternario, entonces la unión del sustrato y la liberación del producto secuenciales ocurre mediante un proceso denominado de “ping-pong”, representado en las Eqs. 2.30 y 2.31:



En este mecanismo, dos pasos independientes ocurren, inicialmente se convierte la enzima en un estado intermedio E' , y esta enzima alterada, independiente de S_1 y P_1 , reacciona con el segundo sustrato. La aspartato aminotransferasa es una enzima de este tipo; cataliza la transferencia de un grupo amino del aspartato al 2-oxoglutarato, quitando en primer lugar el grupo amino del ácido aspártico (S_1), liberando oxaloacetato (P_1), para luego realizar la adición del grupo amino al 2-oxoglutarato (S_2) para producir el ácido glutámico (P_2). El grupo prostético de la enzima es el piridoxal fosfato, que es convertido fácilmente en piridoxamina fosfato por la eliminación de un grupo amino del aspartato, según se muestra en la Figura 2.11.

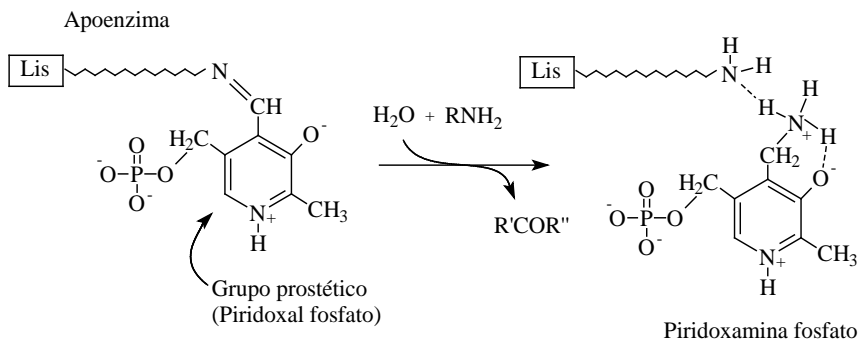


Figura 2.11. Piridoxal fosfato en el sitio activo de la enzima aspartato aminotransferasa.

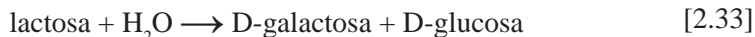
La aspartato aminotransferasa, y el resto de las enzimas que poseen un mecanismo de ping-pong, son descritas por la Eq. 2.32:

$$v = V_{\max} / \{1 + K_{m1}/[S_1] + K_{m2}/[S_2]\} . \quad [2.32]$$

En estos casos, el tercer término en el denominador ($K_{m12}/[S_1] \times [S_2]$ en la Eq. 2.36) está ausente porque no se forma ningún complejo ternario $E \cdot S_1 \cdot S_2$. Los valores individuales de K_{m1} y K_{m2} pueden hallarse realizando dos experimentos separados en los cuales S_1 y S_2 se varíen bajo condiciones de saturación de S_2 y S_1 , respectivamente, de modo que los segundos y primeros términos en el denominador lleguen a ser despreciables.

2.5.6 Ejemplos de reacciones catalizadas por enzimas y su análisis

No siempre es evidente y fácil de determinar si una reacción enzimática debe ser tratada con expresiones cinéticas que consideran un único o dos sustratos. La lactosa hidrolasa cataliza la hidrólisis de lactosa, como se observa más abajo:



el mejor análisis (y quizás obvio) es considerar que esta enzima sigue una cinética simple de Michaelis-Menten, utilizando un único sustrato, puesto que el H_2O , debido a su abundancia, puede ser ignorada como segundo sustrato. Sin embargo, la glucosa oxidasa cataliza una reacción en la que intervienen dos sustratos:



y debe ser tratada utilizando cinética de enzimas que utilizan dos sustratos; se ha demostrado que un mecanismo de tipo ping-pong se aplica para este caso.

La lactato deshidrogenasa (llamada así erróneamente, puesto que funciona generalmente en la dirección contraria y así que hubiera sido más conveniente denominarla piruvato hidrogenasa) representa con todo un sistema más complicado:



En este caso, la pregunta podría ser: ¿se debe considerar al protón (H^+) un tercer sustrato?, de hecho, ha sido tratado de este modo por varios investigadores, los que han demostrado que si el piruvato y las concentraciones del NADH se mantienen niveles de saturación, la velocidad inicial de la reacción enzimática es pH-dependiente, dando lugar a una curva Gaussiana en el rango de pH 6-8. Los datos adquiridos del lado alcalino de esta curva se pueden utilizar para obtener un valor de K_{mH^+} , o, alternativamente, el valor de pH alcalino a $V_{\text{max}}/2$ puede leerse directamente de la curva v versus pH. Investigaciones realizadas han demostrado que, en general, $V_{\text{max}}/2$ ocurre en un valor de pH que es por lo menos dos órdenes de magnitud (dos unidades del pH) respecto al pH óptimo para la reacción, donde $v = V_{\text{max}}$. Esto significa que, a pH óptimo, $[\text{H}^+] \approx 100 \times K_{\text{mH}^+}$, de modo que la desviación de v respecto a la V_{max} es menos del 1%. Además, en una solución tampón, $[\text{H}^+]$ es constante, de modo que las desviaciones de v respecto a la V_{max} aparecen como constantes en la expresión cinética (inclusive si consideramos un pH óptimo estrecho poco habitual). Por lo tanto se ha concluido que, para todos los propósitos prácticos, el H^+ puede ser ignorado sin riesgos como segundo o tercer sustrato.

También debe ser recordado que las enzimas tienen estructuras que dependen del pH. Bajo condiciones excesivamente ácidas o alcalinas, ocurre la desnaturalización de la estructura terciaria

de la proteína, debido a la ruptura de los enlaces de hidrógeno que mantienen normalmente esta estructura, desnaturalización que tendrá efectos dramáticos en la actividad enzimática.

2.6 Activadores enzimáticos

La actividad de enzimas es afectada por una variedad muy grande de compuestos químicos y bioquímicos; estos compuestos afectan la velocidad de la reacción enzimática a pesar de que no se involucran en ella. Los activadores son las especies que aumentan la actividad enzimática; pueden ser necesarios para la enzima posea actividad catalítica (tal como un grupo prostético), o pueden aumentar la actividad específica de una enzima ya activa (iones como Ca^{2+} y Mg^{2+} que interactúan con sustratos que contienen fosfato). A niveles constantes y saturantes de sustrato(s), el incremento de la concentración del activador produce un incremento de la velocidad inicial, alcanzando una velocidad inicial máxima a altas concentraciones de activador. En algunos casos, por ejemplo para la activación de grupos prostéticos, la siguiente secuencia de reacciones puede ser utilizada como modelo para las descripciones cinéticas:



donde A representa la especie del activador. Las secuencias paralelas de la reacción deben ser consideradas si la enzima es catalíticamente activa en ausencia del activador. Con la excepción de la activación por grupo prostético, los activadores son generalmente no-específicos, y varias especies pueden activar de manera similar una enzima. Por ejemplo, la isocitrato deshidrogenasa es activada por Mn^{2+} y Mg^{2+} ; se ha demostrado que, en ausencia de Mn^{2+} , concentraciones tan bajas como sólo 5 ppm de Mn^{2+} pueden ser determinados, mediante la medida de la actividad de la isocitrato deshidrogenasa. Los aniones son también activadores relativamente no específicos, y la activación de la α -amilasa por los aniones de la solución tampón (especialmente Cl^-) ha sido estudiada detalladamente. Una excepción a esta activación no específica producida por iones ocurre con la piruvato quinasa: esta enzima es activada por K^+ , pero es inhibida por Na^+ .

Mientras que las concentraciones del activador pueden ser cuantificadas mediante el análisis de la actividad enzimática, la presencia de concentraciones desconocidas de activadores en muestras utilizadas para la cuantificación del sustrato o de la enzima representa una fuente de error significativa. Si algún activador está presente o es sospechada su presencia en tales muestras, los activadores se agregan en exceso a las muestras y a los estándares de la calibración.

2.7 Inhibidores enzimáticos

Los inhibidores enzimáticos son las especies que causan una disminución de la actividad de una enzima. Los inhibidores generalmente interactúan con la enzima, formando complejos enzima-inhibidor ($E \cdot I$), pero en algunos casos, el mecanismo de la inhibición implica la reacción con uno de los sustratos. La inhibición se considera *reversible* si la enzima recupera su actividad cuando se remueve el inhibidor, e *irreversible* si el inhibidor causa la pérdida permanente de actividad. La inhibición reversible afecta la actividad específica y los valores de los parámetros medidos (K_m y V_{max} aparentes) de Michaelis-Menten (K_m y V_{max} aparentes) para la enzima, mientras que la inhibición irreversible (donde la formación del complejo $E \cdot I$ es irreversible) simplemente disminuye la concentración de enzima activa presente en la muestra. Un ejemplo bien conocido de la inhibición irreversible es el efecto del gas nervioso en la enzima colinesterasa.

Los inhibidores pueden ser cuantificados analizando la disminución de la actividad enzimática, siempre y cuando la muestra desconocida que contiene el inhibidor no contenga la enzima empleada en el análisis de la inhibición. Los estándares son preparados conteniendo una cantidad de constante de enzima, concentración saturante de sustrato, y una concentración variable del inhibidor. Las curvas de calibración que se obtienen, graficando actividad versus [inhibidor], para los inhibidores reversibles e irreversibles, se pueden observar en la Figura 2.12.

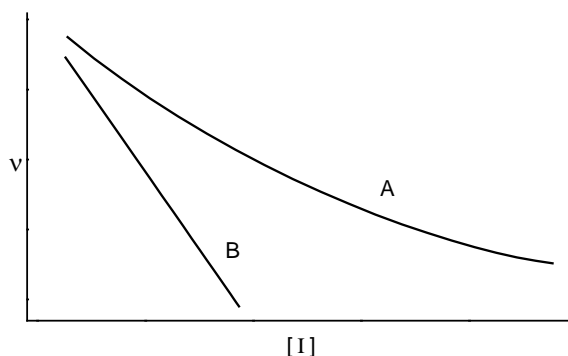


Figura 2.12. Curva de calibración para inhibidores reversibles (A) e irreversibles (B).

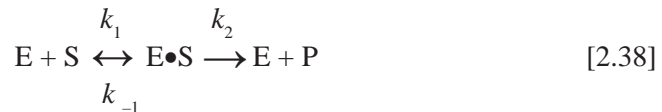
La curvatura observada para la inhibición reversible (Figura 2.12, curva A) indica que un equilibrio de unión con el inhibidor precede la conversión del sustrato en producto. Tres tipos de inhibición reversible pueden ser distinguidos. (1) La inhibición *competitiva* ocurre cuando el grado de inhibición disminuye cuando aumenta la concentración del

II. EZIMAS

sustrato y V_{\max} es inafectada. (2) La inhibición *no-competitiva* existe cuando el grado de inhibición no varía con la concentración del sustrato, y la K_m no es afectada. (3) La inhibición *acompetitiva* existe si el grado de inhibición aumenta cuando aumenta la concentración del sustrato; son afectados tanto V_{\max} como K_m . La inhibición acompetitiva es a menudo interpretada como una mezcla del comportamiento competitivo y no-competitivo.

2.7.1 Inhibición competitiva

Los inhibidores competitivos compiten con el sustrato por el sitio activo de la enzima, pero no se convierten en producto luego de unirse a la enzima. Bloquean el sitio activo, de tal manera de que el sustrato no puede unirse, y su eficacia es descrita por su constante de la inhibición, K_i , que es la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor (k_{-3}/k_3):



En este modelo, el complejo enzima-inhibidor es totalmente inactivo, pero está en equilibrio con la forma activa de la enzima. Para una reacción simple (enzimas que utilizan un único sustrato), el efecto de un inhibidor competitivo en la velocidad inicial de reacción es descrito por la Ecuación 2.40:

$$v = V_{\max} / \{1 + (K_m/[S]) \times (1 + [I]/K_i)\} . \quad [2.40]$$

Al analizar esta ecuación se deduce que los inhibidores competitivos no tienen ningún efecto en la V_{\max} de la enzima, mientras que la alteración del K_m aparente es evidente. En presencia del inhibidor, el K_m aumenta en un factor de $(1 + [I]/K_i)$. Los diagramas de Lineweaver-Burk construidos utilizando varias concentraciones de inhibidor proporcionan una manera útil de diagnosticar este tipo de inhibición. La Figura 2.13 demuestra que una idéntica ordenada de origen ($1/V_{\max}$) se obtiene a diversas concentraciones del inhibidor, mientras que el punto de corte del eje x (la inversa del K_m aparente) disminuye al incrementarse la $[I]$, y es igual a $-1/\{K_m(1 + [I]/K_i)\}$.

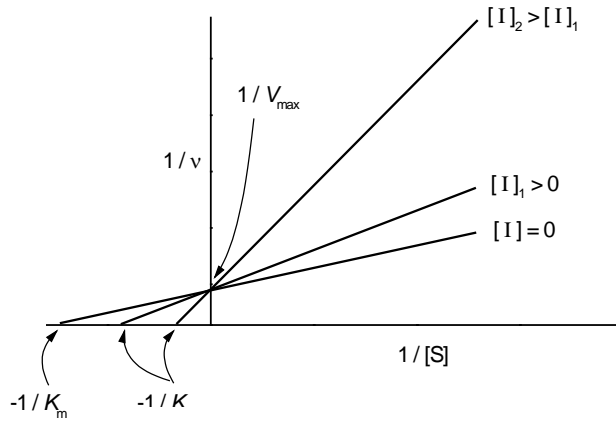


Figura 2.13. Gráficos de Lineweaver-Burk para inhibidores competitivos.

2.7.2 Inhibición no-competitiva

Los inhibidores no-competitivos interactúan reversiblemente con las enzimas para formar una especie inactiva, “removiendo” con eficacia la enzima activa, y así interfiriendo con la velocidad de la conversión del sustrato en producto. El inhibidor puede interactuar con la enzima libre, o con el complejo enzima-sustrato. La característica clave de la inhibición no-competitiva que la distingue de la inhibición competitiva es que la inhibición no afecta la afinidad aparente de la enzima por su sustrato (es decir, su K_m aparente). Por ejemplo, un inhibidor no-competitivo puede unirse en una región alejada del sitio activo, de manera tal de producir un cambio reversible en la estructura terciaria de la enzima que previene totalmente la unión del sustrato y la subsiguiente formación del producto. En este tipo de inhibición, la cantidad de enzima activa parece disminuir mientras que la concentración del inhibidor aumenta, de modo que la V_{max} aparente para la reacción disminuye.

$$v = V_{max} / \{ (1 + [I]/K_i) \times (1 + K_m/[S]) \} \quad [2.41]$$

donde $V_{max,app} = V_{max} / \{ 1 + [I]/K_i \}$

La Figura 2.14 muestra un gráfico de Lineweaver-Burk, típico para inhibición no-competitiva.

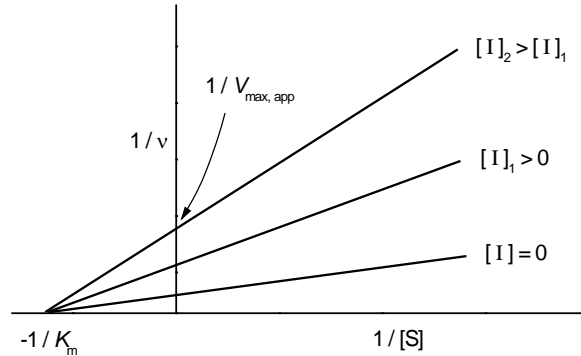


Figura 2.14. Gráficos de Lineweaver-Burk para inhibidores no-competitivos.

2.7.3 Inhibición incompetitiva

Los inhibidores incompetitivos se unen al complejo ES, afectando tanto el K_m aparente como la V_{max} aparente de una reacción enzimática. Su comportamiento se aproxima a lo expresado por la Ecuación 2.42:

$$v = V_{max} / \{ (K_m/[S]) + ([I]/K_i) + 1 \} . \quad [2.42]$$

En este caso, los diagramas de Lineweaver-Burk (Fig. 2.15) rinden una serie de líneas paralelas (en el caso de enzimas que utilizan un sustrato), que cortan a la ordenada en la inversa de la V_{max} aparente, $1/V_{max,app} = \{1 + [I]/K_i\}/V_{max}$, y al eje x en la inversa negativa del K_m aparente, $1/K_{m,app} = -\{1 + [I]/K_i\}/K_m$. El modelo utilizado para describir la inhibición incompetitiva predice un cambio equivalente del K_m y la V_{max} , dando por resultado líneas de pendiente idéntica.¹¹

2.8 Unidades enzimáticas y concentraciones

Las concentraciones de enzima se pueden representar de una manera idéntica a la utilizada para compuestos no catalíticos, por ejemplo en unidades molares o como masa sobre volumen. La información requerida para este cálculo es mínima: el porcentaje de pureza

11. "Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations" T.M. Devlin Ed., J. Wiley & Sons, New York, 1982. P. 166.

de la preparación enzimática, el peso molecular de la enzima, la masa y el volumen de la solución preparada. Sin embargo, las concentraciones de enzima raramente se representan de esta manera, debido a que tales valores no brindan ninguna información acerca del poder catalítico de la solución preparada.

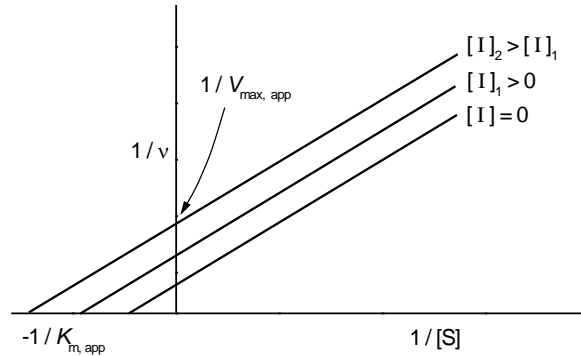


Figura 2.15. Gráficos de Lineweaver-Burk para inhibidores acompetitivos.

La concentración de una solución enzimática se expresa generalmente como el número de *Unidades Internacionales* (I.U.) por unidad de volumen. La unidad internacional se define como esa cantidad de enzima requerida para consumir un micromol de sustrato por minuto a una temperatura y un pH dados, bajo condiciones de saturación del sustrato:

$$\text{Unidad Internacional (I.U.)} = 1 \text{ micromol de sustrato consumido/minuto} \quad [2.43]$$

Dado que una I.U. es habitualmente una cantidad muy grande de enzima, las concentraciones suelen expresarse en miliunidades (mU) o microunidades (μU) por litro o mililitro.

Para convertir estas unidades a las concentraciones molares, es necesario conocer la actividad (turnover number), k_{cat} , de la enzima utilizada. Para una enzima que utiliza un único sustrato $k_{\text{cat}} = k_2$. Este valor es una característica fundamental de una enzima, indicando la velocidad máxima a la cual el sustrato puede ser consumido, y se expresa generalmente en unidades de s^{-1} . En condiciones de saturación de sustrato,

$$v = V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} [\text{E}]_0 \text{ (mol S convertido} \times \text{s}^{-1} \times \text{L}^{-1}) . \quad [2.44]$$

V_{max} se obtiene de la cantidad de I.U. de actividad enzimática presente en un volumen dado (V_{T}) de solución enzimática:

$$\begin{aligned} V_{\text{max}} &= (10^{-6} \text{ mol/mmol}) \times (1 \text{ min}/60 \text{ s}) \times (\text{I.U.}/V_{\text{T}}) , \text{ o} \\ &= (1,67 \times 10^{-8}) \times (\text{I.U.}/V_{\text{T}}) \times (\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{L}^{-1}) . \end{aligned} \quad [2.45]$$

II. EZIMAS

Combinando las Eqs. 2.44 y 2.45, la concentración molar de una solución enzimática puede ser encontrada:

$$[E]_0 = (1,67 \times 10^{-8}) \times (I.U./V_T) \times (1/k_{cat}) . \quad [2.46]$$

Mientras que la Eq. 2.46 se prefiere para el cálculo de $[E]_0$, requiere como dato el valor de k_{cat} para la enzima del interés bajo las condiciones requeridas para su uso, y este valor no está siempre disponible en la literatura.

La *actividad específica* se define como las I.U. de enzima por unidad de peso (bajo dadas condiciones de T y pH), y se considera una medida de pureza de la enzima: cuanto más alta es la actividad específica de una preparación enzimática dada, mayor es su pureza. La actividad específica se informa generalmente en I.U. por miligramo de enzima sólida. Si el peso molecular de una enzima es conocido, y si una dada preparación enzimática puede asumirse que es 100% pura, entonces su actividad específica se puede utilizar para estimar el k_{cat} con la Eq. 2.47:

$$k_{cat} = (1,67 \times 10^{-5}) \times (\text{Actividad específica}) \times (\text{Peso molecular}) , \quad [2.47]$$

donde la constante se ha calculado para la actividad específica en I.U./mg, el peso molecular en Daltons, y el k_{cat} en s^{-1} .

Debido a las unidades no estandarizadas asociadas al sistema de I.U. para definir concentraciones enzimáticas, se ha definido un equivalente en el sistema de unidades S.I. denominado *Katal*. Un Katal es la cantidad de enzima con una actividad enzimática que consumirá un mol de sustrato por segundo; un microkatal es igual a 60 I.U.

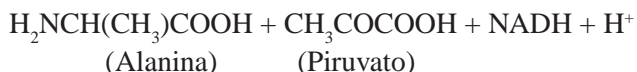
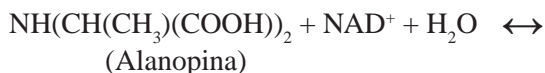
Cuando una concentración de enzima es expresada como actividad por unidad de volumen, debe ser especificada la temperatura en la cual se mide la actividad. Las reacciones catalizadas enzimáticamente, aún las más simples (un sustrato) consisten en por lo menos tres etapas, que son dependientes de la temperatura: la formación del complejo enzima-sustrato, la conversión de este complejo en el complejo enzima-producto, y la disociación del complejo del enzima-producto. El efecto total de la temperatura en las velocidades de reacción es una combinación de los efectos producidos en cada etapa. En general, un aumento de 10 °C en T incrementará al doble la velocidad de una reacción enzimática. El control de la temperatura es necesario para obtener mediciones reproducibles de la velocidad de reacción, baños termostáticos que regulan a la décima de grado son usualmente utilizados (+/- 0,1 °C). Temperaturas menores a los 40 °C se emplean generalmente, para evitar la desnaturalización de la proteína enzimática.

2.9 Lecturas sugeridas

- N.C. Price y L. Stevens, “*Fundamentals of Enzymology*”, 2^{da} Ed., Oxford Science Publishers, 1989.
- R.A. Copeland, “*Enzymes*”, 2^{da} Ed., Wiley-VCH, New York, 2000.
- International Union of Biochemistry, “*Enzyme Nomenclature*”, Academic Press, Orlando, 1984.
- A. Cornish-Bowden, “*Fundamentals of Enzyme Kinetics*”, Butterworths, London, 1979.
- D.L. Purich, “*Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism*”, Academic Press, New York, 1983.
- K.J. Laidler y P.S. Bunting, “*The Chemical Kinetics of Enzyme Action*”, Oxford University Press, London, 1973.

2.10 Problemas

1. La enzima alanopina deshidrogenasa cataliza reversiblemente la reacción que puede observarse al final de este párrafo. Está presente en moluscos bivalvos, tales como los mejillones, que viven en regiones intertidales. Durante las mareas bajas estos moluscos son expuestos a condiciones de escasez de agua, sobreviviendo mediante el aislamiento del medio externo, cerrando mas o menos herméticamente su valva. En estas condiciones, su metabolismo cambia, abandonado la vía metabólica aeróbica de la lactato deshidrogenasa por la vía anaeróbica de la alanopina deshidrogenasa. Los moluscos expuestos acumulan alanopina en sus tejidos, y los niveles de alanopina se han relacionado con la duración de la exposición fuera del agua.



- (a) ¿Considerando la reacción expresada arriba en el sentido directo (de alanopina a alanina) debe considerarse que la enzima alanopina deshidrogenasa utiliza uno, dos o tres sustratos? ¿Por qué?
- (b) Se ha demostrado que la alanopina deshidrogenasa del mejillón tiene valores de K_m para alanopina y para NAD^+ de 17 mM y de 0,22 mM, respectivamente. ¿Qué concentración mínima de NAD^+ se debe utilizar para obtener una dependencia lineal de

II. EZIMAS

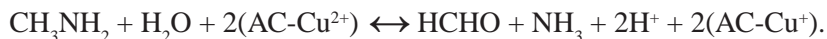
la velocidad inicial de la reacción respecto a la concentración de alanopina? ¿Sobre qué rango de concentraciones de alanopina se espera que la dependencia lineal se mantenga?

- (c) En la dirección inversa de la reacción, se ha encontrado que el producto NAD^+ actúa como inhibidor reversible de la alanopina deshidrogenasa. Bajo condiciones de exceso de alanina y piruvato, la velocidad inicial de la reacción fue medida en función de la concentración de NADH, con concentraciones de NAD^+ iniciales de 0, 1 y 2 mM. Los diagramas de Lineweaver-Burk de $1/v$ versus $1/[\text{NADH}]$ fueron construidos utilizando estos datos, y estos diagramas demostraron que la ordenada de origen (intersección con el eje y) era idéntica en las tres concentraciones iniciales de NAD^+ . En cuanto al eje x, este fue cortado a valores negativos, y tendiendo a cero a concentraciones iniciales más altas de NAD^+ . ¿Qué clase de inhibidor es el NAD^+ ? ¿Qué efecto tiene el NAD^+ sobre el K_m y la V_{\max} para el NADH?

2. Una enzima que tiene un peso molecular de 47 kD se encuentra en una preparación que es 100% pura, con una actividad específica de 700 I.U./mg cuando es ensayada a 25 °C en solución tampón fosfato pH 7,5. Esta enzima ha sido descrita como monomérica (un sitio activo por molécula de enzima).

- (a) Calcule la masa de la preparación enzimática pura necesaria que debe agregarse a 100 mL de solución tampón (saturado con los sustratos) para producir una solución que consuma el sustrato inicialmente a una velocidad de 5×10^{-7} M/min.
- (b) Calcule la k_{cat} para la enzima.
- (c) Una segunda preparación de esta enzima fue probada para actividad. En 100 mL de solución tampón, 1,6 mg de la enzima sólida fueron disueltos. Esta solución de la enzima fue mezclada con una solución de sustrato en la relación 500:1500 mL, y en la solución final, todos los sustratos estaban presentes en gran exceso respecto a sus valores de K_m . Mediante espectrofotometría de absorbancia se cuantificó el consumo de sustrato, determinándose que 0,32 mM de sustrato fueron consumido por minuto. Calcule la actividad específica de la preparación enzimática.

3. La enzima metilamina deshidrogenasa cataliza la oxidación de aminometano (aminomethane) a formaldehído según la ecuación siguiente:



Donde la abreviatura AC representa la amicianina (amicyanin, se encuentra *Paracoccus denitrificans*), una proteína “azul” que contiene cobre, y actúa como un aceptor de electrones fisiológico (uno por molécula). La AC puede ser substituida *in vitro* por el aceptor de electrones de bajo peso molecular denominado fenazina etosulfato (phenazine ethosulfate, PES). El PES se oxida en un solo paso donde transfiere dos electrones, de modo que una

estoiquiometría 1:1 se mantiene entre el aminometano y el PES. La forma reducida de PES reacciona rápidamente con 2,6-dicloroindofenol, otra vez siguiendo una estoiquiometría 1:1, para producir un producto intensamente coloreado con un máximo de absorbancia a 600 nm, con una absorbancia molar de $2,15 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Calcule el cambio inicial de la absorbancia respecto al tiempo que esperaría utilizando una cubeta de 1 cm de paso óptico a 600 nm, para una solución que contiene exceso de aminometano, PES y 2,6-dicloroindofenol, si la solución también contiene 20 ng/mL de una preparación de metilamina deshidrogenasa que se sabe tiene una actividad específica de 16 I.U./mg.

4. Una enzima convierte el sustrato S en el producto P, y obedece el comportamiento simple de Michaelis-Menten para enzimas que utilizan un sustrato. Los datos siguientes de velocidad fueron obtenidos con $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ de enzima a 25 °C en solución tampón fosfato pH 7,2:

[S], mM	4,000	1,336	0,800	0,568	0,448	0,368
Velocidad inicial, mmol/min	0,648	0,488	0,418	0,353	0,310	0,275

Utilizando los métodos de Eadie-Hofstee y de Cornualles-Bowden-Eisenthal, determinar los valores de K_m y V_{\max} para esta enzima. ¿Cuál probablemente estime más exactamente esos valores? De estos resultados, calcule el k_{cat} para la enzima.

5. Un gráfico de Hanes de $[S]/v$ versus $[S]$, obtenido utilizando una concentración constante de enzima (T y pH óptimos) produce una recta con una pendiente positiva de 100 min/mM, interceptando al eje y en 0,0020 min.

(a) Calcule V_{\max} y K_m para la enzima.

(b) Si la solución contenía 10 ng/mL de la enzima sólida (liofilizada), calcule la actividad específica de la preparación enzimática.

CAPÍTULO 3

CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS Y SUS SUSTRATOS

3.1 Introducción

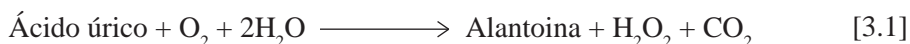
La cuantificación de enzimas y sustratos ha sido durante mucho tiempo de importancia crítica en química clínica, desde que se conoce que ciertos niveles metabólicos de una variedad de especies pueden ser asociados con ciertos estados de enfermedad. Los métodos enzimáticos pueden utilizarse en matrices complejas, como suero u orina, debido a la elevada selectividad que manifiestan las enzimas para sus sustratos naturales. Debido a esta selectividad, también se utilizan los ensayos enzimáticos en las áreas de investigación química y bioquímica. Este Capítulo considera métodos experimentales cuantitativos, las especies bioquímicas que pueden ser medidas, como es que la medición es realizada, y como los datos experimentales se relacionan con la concentración. Este Capítulo asume familiaridad con los principios de los métodos espectroscópicos (absorbancia, fluorescencia, quimioluminiscencia y bioluminiscencia, nefelometría y turbidimetría), los métodos electroquímicos (potenciometría y amperometría), calorimetría y métodos radioquímicos. Para el estudio de estos temas, el estudiante es referido a la obra de Daniel C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis, (6ta Ed.)*, publicado por Freeman (2003). Además, los métodos estadísticos y definiciones, como la de límite de detección, relación señal a ruido (S/N), sensibilidad, desviación estándar relativa (RSD) y la regresión lineal son asumidos como conocimientos previos; el Capítulo 16 de este volumen discute algunos de estos parámetros estadísticos.

La literatura bioquímica utiliza a menudo los términos límite de detección y sensibilidad de manera equivalente. Nosotros utilizaremos *límite de detección* para describir la mínima cantidad perceptible de analito, siendo esta cantidad la requerida para generar una señal cuya magnitud sea dos o tres desviaciones estándar superior a la señal obtenida para el blanco de reactivos (es decir, una solución que contiene todo excepto el analito). La pendiente de la curva de calibración, resultante de graficar la señal analítica versus la concentración del analito, se define como la *sensibilidad* de un análisis cuantitativo; a mayor sensibilidad menores cambios de concentración del analito podrán ser cuantificados. Se desprende de esta definición que, para las curvas de calibración no lineales, la sensibilidad sea una función de la concentración. Estas definiciones siguen las convenciones habitualmente utilizadas en química analítica.

3.2 Depleción de sustrato y acumulación de producto

Cuando un sustrato puede ser medido directamente, la razón de usar un análisis enzimático para su cuantificación puede no ser evidente. Sin embargo, los medios complejos de las matrices biológicas (sangre, leche, etc.) pueden contener una variedad de especies que interfieran con la medida directa de la concentración del analito. Por ejemplo, si el analito absorbe en la región visible o ultravioleta, la cuantificación directa puede dar lugar a valores erróneamente altos si alguna especie interferente absorbe en la longitud de onda utilizada. Un método enzimático, por otra parte, puede basarse en la medición de la disminución de la absorbancia que ocurre como resultado de la consumición selectiva del analito por la enzima, evitando así la interferencia espectral.

Un análisis para el ácido úrico implica la utilización de la enzima urato oxidasa, que cataliza la reacción siguiente:



Mientras que la alantoina es difícil de medir espectrofotométricamente, el ácido úrico posee una fuerte absorción ultravioleta con un máximo en 293 nm (absorbancia molar $1,22 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).¹ La cuantificación del ácido úrico implica así la medición de la *disminución* de A_{293} .

La coenzima A (CoA) puede ser cuantificada utilizando la enzima fosfotransacetilasa, la que cataliza la acetilación de CoA por acetilfosfato:



En este caso, la acumulación de CoA-S-COCH_3 es medida, dado que esta especie tiene un máximo de absorción a 232 nm (absortividad molar $4,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).² Por ello, la absorbancia a A_{232} *augmentara* durante el curso de la reacción.

En algunas reacciones enzimáticas, el sustrato y el producto pueden ser medidos fácilmente; en estos casos, la reacción puede seguirse midiendo el agotamiento del sustrato o bien la acumulación del producto. La elección de la especie óptima para ser medida depende entonces de las características mensurables del sustrato y del producto y de la técnica de la medida empleada, de modo que una comparación de sensibilidades y de límites de detección es necesaria.

Por ejemplo, si el sustrato y el producto son fluorescentes con absorbancias molares y rendimientos cuánticos idénticos, pero diversas longitudes de onda de excitación o de emisión, se prefiere la cuantificación del producto porque un pequeño aumento en intensidad de la

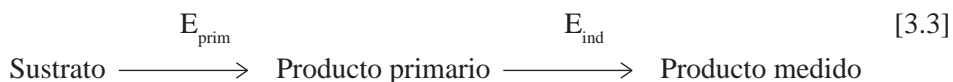
1. P. Plesner y H.M. Kalckar en "*Methods of Biochemical Analysis*", D. Glick, Ed., Wiley, New York, 1956. Vol. 3, p. 99.

2. G.D. Novelli en "*Methods of Biochemical Analysis*", D. Glick, Ed., Wiley, New York, 1955. Vol. 2, p. 208.

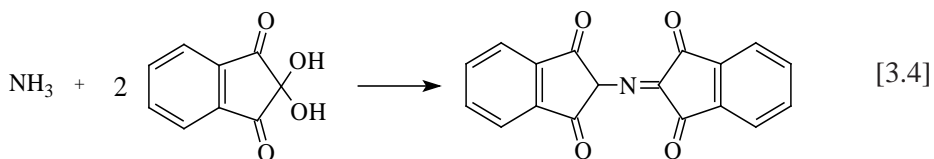
fluorescencia se mide fácilmente cuando está sobrepuesto en una señal del fondo cercana a cero, donde la magnitud del ruido es muy baja. Se requiere una decisión más complicada se emplea espectrometría de absorbancia, y tanto sustrato como producto tienen absorptividades molares idénticas. Las medidas de absorbancia son generadas por instrumentos que miden realmente la cantidad de luz transmitida a través de una muestra, de modo que las señales más grandes (y con la precisión más pobre) se obtienen cuando las concentraciones del analito son las más bajas. Los mejores valores de RSD se obtienen para valores de absorbancia de entre 0,1-2,0. Aunque generalmente se prefiere medir la acumulación de producto, una comparación rigurosa de los datos de calibración obtenidos mediante la medición del sustrato y del producto es necesaria para establecer cuál es el método óptimo, cuando el método involucra la medición directa de la absorbancia de producto o sustrato. En la práctica, la acumulación del producto se mide casi invariablemente de una manera indirecta, puesto que es a menudo posible acoplar una segunda reacción en serie con la primera reacción selectiva al sustrato, para generar un producto secundario que puede ser medido más fácilmente.

3.3 Mediciones directas y acopladas

Algunas reacciones enzimáticas se pueden seguir directamente, mediante la medición del agotamiento del sustrato o la acumulación de producto, con la precisión adecuada para los análisis enzimáticos directos. Sin embargo, muchas enzimas catalizan reacciones que implican especies que no pueden ser medidas fácilmente. En estas situaciones, los productos se convierten a las especies que son mensurables, en una reacción *acoplada*, o *indicadora*. La reacción del indicador puede ser química o enzimática, y convierte cuantitativamente el producto de la reacción primaria en una especie fácilmente mensurable. El requisito principal para la reacción del indicador, sea esta química o enzimática en naturaleza, es que la conversión del producto primario en el producto medido debe ser rápida y cuantitativa.



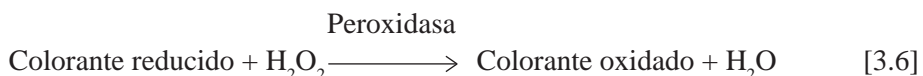
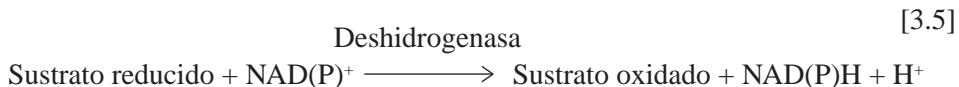
Un análisis para la adenosina utiliza como enzima primaria la adenosina deaminasa, y una reacción química indicadora que consume el amoníaco por la reacción con el reactivo de ninhidrina (Ecuación 3.4):



III. CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS Y SUS SUBSTRATOS

El producto de esta reacción absorbe en el visible, con un máximo a 546 nm. La reacción indicadora con ninhidrina³ puede ser empleada virtualmente con cualquier reacción primaria que libere NH₃.

Posiblemente las enzimas más comúnmente usadas como indicadores son las deshidrogenasas y peroxidases. Las reacciones catalizadas por ellas se muestran a continuación:



Las deshidrogenasas se utilizan en los casos donde la reacción enzimática primaria produce el sustrato reducido para una determinada reacción catalizada por una deshidrogenasa. Estas especies entonces se convierten en sus formas oxidadas por la reacción indicadora, donde la formación de la coenzima reducida de la nicotinamida (NADH o NADPH) permite medidas de la absorbancia a 340 nm, donde la absortividad molar⁴ de la coenzima reducida es de $6,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Fig. 3.1). Las reacciones indicadoras utilizando deshidrogenasa son comunes porque pocas interferencias existen para las medidas de la absorbancia a 340 nm.

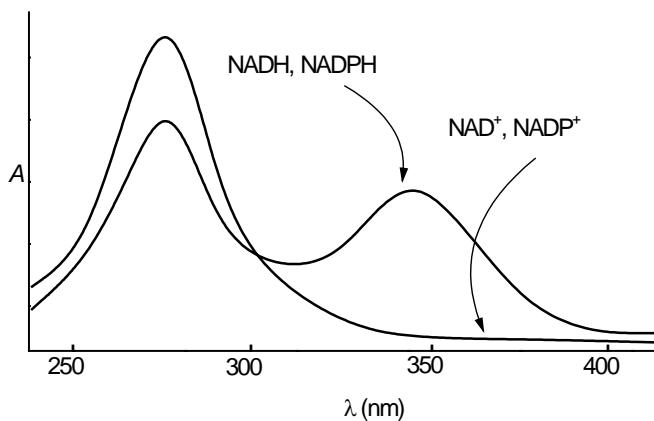


Figura 3.1. Espectro de absorción para coenzimas de nicotinamida.⁴ Reprinted, by permission, from H. Netheler in “*Methods of Enzymatic Analysis*”, Academic Press, 1974, Vol. 1, Edited by Hans Ulrich Bergmeyer, 2nd English Edition, Translated from the 3rd German Edition. © Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr., 1974

3. W. Appel en “*Methods of Enzymatic Analysis*”, H.U. Bergmeyer, Ed., Academic Press, New York, 1974. Vol. 2, pp. 989-992.

4. H. Netheler en “*Methods of Enzymatic Analysis*”, H.U. Bergmeyer, Ed., Academic Press, New York, 1974. Vol. 1, pp. 184, 187.

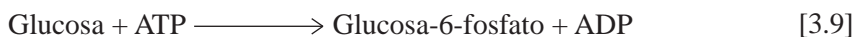
Las reacciones indicadoras utilizando peroxidasa pueden ser utilizadas para seguir cualquier reacción primaria que produzca peróxido de hidrógeno. Las peroxidasas son muy específicas para H_2O_2 , pero reaccionarán con una variedad de especies orgánicas colorantes, especies que son descoloridas en su forma reducida, pero que absorben la luz fuertemente en su forma oxidada. Algunos ejemplos incluyen 2,4-diclorofenol, *O*-dianisidina, verde de malaquita, y bencidina.

Dos tipos de análisis enzimáticos comerciales existen para la determinación de glucosa en suero empleando reacciones indicadoras. Uno de ellos utiliza la glucosa oxidasa como enzima primaria, y la peroxidasa como enzima indicadora:



La forma oxidada del *O*-dianisidina es roja, con una absorbancia máxima a 450 nm y una absorptividad molar⁵ de $8,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

El segundo análisis de glucosa implica la utilización de hexoquinasa como enzima primaria, y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa como enzima indicadora:



De acuerdo con las absorbancias molares de los productos, se espera que el análisis de glucosa utilizando el sistema oxidasa/peroxidasa alcance una mayor sensibilidad y un límite de detección más bajo.

Idealmente, la enzima del indicador convierte el producto primario en el producto medido de una manera "lineal", esto es, que cada molécula del producto primario sea transformada instantáneamente, sin importar la concentración del sustrato. Para lograr esto, las concentraciones del producto primario son mantenidas bajas, de manera tal que se mantengan en la región lineal de la curva cinética de saturación. Para la conversión lineal en todas las concentraciones del analito (sustrato primario), la velocidad efectiva de la reacción del indicador, $(V_{\text{eff}})_{\text{ind}}$, debe igualar V_{max} para la reacción primaria:

$$(V_{\text{max}})_{\text{prim}} = (V_{\text{eff}})_{\text{ind}} = (V_{\text{max}})_{\text{ind}} / \{1 + K_{m,P1}/[P1] + K_{m,S2}/[S2]\} \quad [3.11]$$

Dado $K_{m,P1}$ es una característica de la enzima indicadora, y [P1] es determinado por la concentración del analito, las únicas variables que pueden ser controladas experimentalmente

5. A. Claiborne y I. Fridovich, *Biochemistry* **18**, 1979, 2324-2329.

III. CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS Y SUS SUBSTRATOS

son $(V_{\max})_{\text{ind}}$, que es igual a $k_{\text{cat}} [E_{\text{ind}}]$ (como se explica en el Capítulo 2) y la concentración del cosustrato [S2]. Por esta razón, un exceso importante (cien veces o más) de la enzima del indicador es empleado, además de emplear niveles saturantes del cosustrato (*O*-dianisidina en Eq. 3.8, y NADP⁺ en Eq. 3.10).

Al hacer medidas de la velocidad inicial de reacción en sistemas de enzimas acopladas, hay a menudo un tiempo de retraso significativo durante el cual la concentración de los productos del acoplamiento aumenta hasta alcanzar un estado de equilibrio.⁶ También debe ser recordado que algunas reacciones que catalizan las deshidrogenasas poseen equilibrios desfavorables; la lactato deshidrogenasa, por ejemplo, que cataliza la reacción que puede observarse en Eq. 3.12:



prefiere convertir el piruvato en lactato ($K = 5 \times 10^{-5}$) a pH 7. Por esta razón, una reacción acoplada entre la lactato deshidrogenasa y una enzima que produzca lactato no será eficaz, a menos que se utilice un reactivo para eliminar el piruvato del medio de reacción, de tal manera de forzar la reacción hacia la formación de productos. Por ejemplo, en pH 9,5, fenilhidracina atraparé el piruvato para producir fenilhidrazona, cambiando el equilibrio de la lactato deshidrogenasa a $K = 2 \times 10^{-2}$.⁷ Alternativamente, NADH puede ser atrapado (oxidado) con un reactivo capaz de transferir electrones, como fenacina metosulfato (phenazine methosulfate, PMS), que es incoloro en la forma oxidada pero absorbe fuertemente a 388 nm en la forma reducida.

3.4 Clasificación de métodos

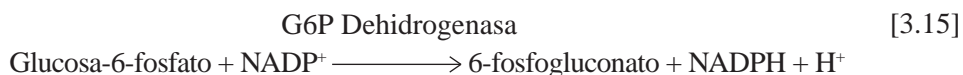
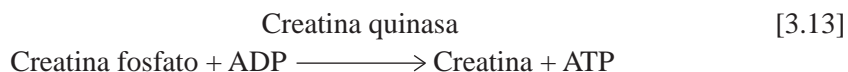
Los métodos de análisis enzimáticos pueden clasificarse como análisis a tiempo fijo, análisis a variación fija, y análisis cinético (velocidad inicial). Los análisis cinéticos monitorean continuamente la concentración en función de tiempo; las reacciones siguen generalmente una cinética de pseudo primer hasta alcanzar el 10% de su valor final, permitiendo que la velocidad inicial de la reacción pueda ser calculada. Si la concentración inicial de sustrato es mayor que $10K_m$, entonces la velocidad inicial será directamente proporcional a la concentración de la enzima. Si las concentraciones iniciales de sustrato son bajas ($< 0,1K_m$), la velocidad inicial será directamente proporcional a la concentración inicial del sustrato (ver Capítulo 2). Para la cuantificación de la enzima,

6. S.P.J. Brooks y C.H. Suelter, *Anal. Biochem.* **176**, 1989, 1-14.

7. J. King, "Practical Clinical Enzymology", Van Nostrand, Princeton, 1965.

un diagrama de la velocidad inicial versus [E] proporciona una curva de calibración lineal, mientras que un diagrama lineal de velocidad inicial versus [S] se utiliza para la cuantificación del sustrato.

Un ensayo comercial para la creatina quinasa del suero⁸ emplea el método cinético para la cuantificación de la enzima. Este es un ensayo acoplado de tres enzimas, involucrando la siguiente serie de reacciones:



En este análisis, el suero diluido es preincubado con glucosa, hexoquinasa, NADP+ deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato para permitir que toda la creatina fosfato y ADP presentes en la muestra de suero se consuman. Cuando se alcanza un valor constante a A_{340} , una solución de reactivo que consiste en creatina fosfato concentrado y ADP es agregado, y el aumento en A_{340} se mide en función del tiempo. Un registro típico se observa en la Figura 3.2. La pendiente la sección inicial lineal de esta curva es directamente proporcional a la concentración de la enzima.

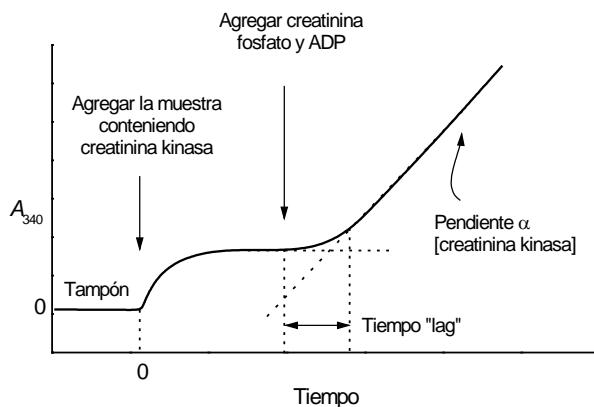


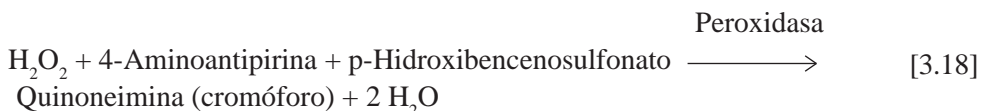
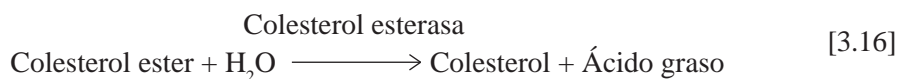
Figura 3.2. Resultado de un ensayo cinético para creatina quinasa.

8. Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, 1994 Catalogue. p. 2197.

III. CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS Y SUS SUBSTRATOS

Los análisis a tiempo fijo incluyen aquellos llamados de “punto final” (“endpoint”), y miden el cambio de [S] o [P] que ocurre en periodo fijo de tiempo, relativamente largo. En estos ensayos se espera una conversión cuantitativa (o cuasi-cuantitativa) del sustrato en producto, y se utilizan exclusivamente para la cuantificación del sustrato. Una curva de calibración lineal de respuesta versus la concentración inicial de sustrato se utiliza para cuantificar el sustrato. Los análisis a tiempo fijo no requieren $[S]_0 < 0,1K_m$, puesto que esencialmente ocurre la conversión completa del sustrato en producto. Este tipo de análisis no se puede utilizar para la cuantificación de la enzima dado que las condiciones de saturación de sustrato no se mantienen durante la duración toda la reacción.

Un análisis comercial para colesterol total en suero⁹, cuya medición se realiza en el punto final, emplea tres enzimas, colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa:



El colesterol del suero existe como una mezcla de ésteres de ácidos grasos y colesterol libre. La cuantificación del colesterol total implica la conversión inicial de los ésteres al colesterol libre, seguida por la conversión total del colesterol libre a su producto de oxidación. Luego del acoplamiento con la reacción indicadora de peroxidasa, se obtiene un producto coloreado. Mediciones de absorbancia (A_{500}) utilizando colesterol de grado analítico permiten construir una curva de calibración. Un blanco de reactivos es preparado utilizando todos los componentes excepto colesterol, y este valor se resta de todos los valores medidos de A_{500} , corrigiendo los valores de absorbancia para cualquier oxidación del colorante no debida a la reacción de interés.

Los análisis a variación fija son relativamente infrecuentes y se utilizan para la cuantificación de enzima. Estos análisis registran el tiempo requerido para la generación de una concentración dada de producto. La concentración de la enzima se relaciona inversamente con el tiempo requerido para que ocurra este grado de reacción, entonces, un gráfico lineal de $1/t$ versus [E] se utiliza como curva de calibración.

9. Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, 1994 Catalogue. p. 2194.

3.5 Métodos instrumentales

Una amplia variedad de métodos instrumentales son utilizados para cuantificar las enzimas y sus sustratos. La selección del método depende sobre todo de las características físicas de la especie que debe ser medida, siendo esta generalmente el producto de la reacción enzimática o de la reacción del indicador. En esta sección, los métodos de detección instrumentales se clasifican en tres muy amplios grupos, métodos ópticos, electroquímicos u “otros”, esta última categoría incluye los métodos radioquímicos y manométricos.

3.5.1 Métodos ópticos

3.5.1.1 Absorbancia.

La detección del agotamiento de sustrato o de la acumulación de producto a través de la medida de la absorbancia, cuando una muestra es iluminada con luz visible o ultravioleta se basa en la ley de Beer-Lambert, que relaciona directamente la absorbancia a dada longitud de onda con la concentración:

$$A = \epsilon bC \quad [3.19]$$

donde b es la longitud de la trayectoria de la muestra atravesada por la luz, y ϵ es una constante para dada especie molecular a determinada longitud de onda y bajo condiciones fijas de temperatura, solvente y pH. Esta ley es válida para virtualmente toda especie que absorba luz a bajas ($< 0,1$ mM) concentraciones. Las desviaciones aparentes de la ley de Beer-Lambert ocurren si los analitos están involucrados en equilibrios reversibles (tales como protonaciones dependiente del pH o reacciones de asociación) o si se descomponen en solución.

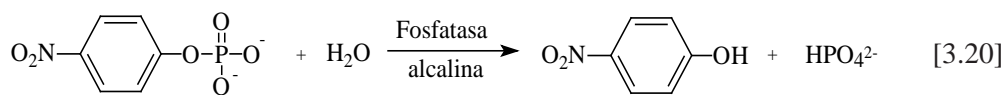
La sensibilidad de un análisis basado en absorbancia depende directamente de ϵ , la absorptividad molar de la especie que es medida. Por ejemplo, consideraremos los dos análisis para la glucosa presentados en las Eqs. 3.7-3.8 y 3.9-3.10. En el primero de ellos, la peroxidasa produce el cromóforo 2,2'-dimetoxi-p-fenilenediimina (2,2'-dimethoxy-p-phenylenediimine), en una relación estequiométrica de 1:1 con la glucosa consumida en la reacción con la glucosa oxidasa. En el segundo método, NADPH es la especie que es medida, y también es producido en una relación estequiométrica de 1:1 respecto a la glucosa. La sensibilidad es la pendiente de la curva de la señal versus la concentración, de modo que una comparación de los dos análisis requiere una comparación de estas pendientes. Si las reacciones del indicador han sido configuradas para la conversión lineal del sustrato primario en producto medido, después de dado periodo de tiempo, cantidades idénticas de glucosa rendirán cantidades idénticas de producto medido para los dos esquemas de reacción. Dado que $\Delta A = \epsilon b \Delta C$, y

III. CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS Y SUS SUBSTRATOS

ΔC es idéntico para los dos análisis, la magnitud de la señal generada dependerán de ϵ . Para la reacción indicadora de peroxidasa, el cromóforo oxidado tiene una $\epsilon = 8,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 450 nm, mientras que la reacción de la deshidrogenasa produce NADPH, con una $\epsilon = 6,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 340 nm. Claramente, la pendiente de la curva de calibración de ΔA (para los análisis a tiempo fijo) o $\Delta A/\Delta t$ (para los análisis cinéticos) versus [glucosa] (es decir, la sensibilidad del análisis) será mayor para la reacción indicadora de la peroxidasa.

Los límites de detección de los análisis basados en la medición de la absorbancia son también dependientes de la absorbancia molar. Hemos definido el límite de detección de un análisis como la concentración mínima de analito requerida para generar una señal dos o tres veces más grandes que la desviación de estándar medida en blanco ($A_{\text{med}}/\sigma_A = 2$ o 3). Si la magnitud del ruido en el blanco es comparable para las medidas realizadas a 340 y 450 nm, entonces valores comparables de absorbancia serán medidos en el límite de detección. Bajo estas condiciones, dado que $A = \epsilon bC$, una absorptividad molar más alta posibilitará la detección de una concentración más baja del analito. Se espera entonces que el límite de detección del análisis basado en el sistema cromóforo/ peroxidasa sea más bajo que el del análisis basado en deshidrogenasa por un factor de $8600/6200$ (aproximadamente 1,4). Los límites de detección de los análisis enzimáticos para cuantificar sustratos están generalmente en el rango micromolar de concentración.

La fosfatasa alcalina del suero, que es un indicador metabólico importante, es cuantificada generalmente por métodos de absorbancia. La fosfatasa alcalina cataliza la desfosforilación del NADP^+ y una variedad de otros sustratos *in vivo*, pero *in vitro*, el sustrato sintético p-nitrofenilfosfato (Eq. 3.20) puede ser utilizado:

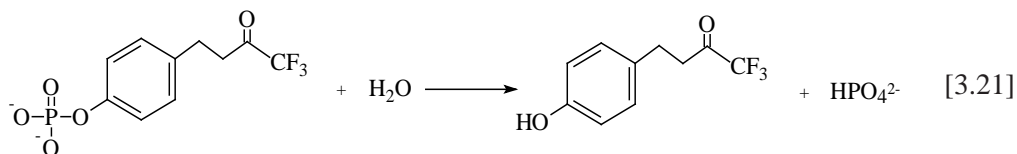


El producto, nitrofenol, absorbe a 405 nm^{10} con una $\epsilon = 1,85 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Cuando a una muestra diluida de suero se le agregan concentraciones saturantes de p-nitrofenilfosfato, y se incuba a temperatura ambiente por 15 minutos, y luego se mide la absorbancia a 405 nm, el límite de detección del análisis para fosfatasa alcalina es $4 \times 10^{-12} \text{ M}$ en la muestra original de suero. Este valor puede parecer una concentración muy baja, sin embargo, las pruebas de diagnóstico requieren a menudo un límite de detección aún mejor.

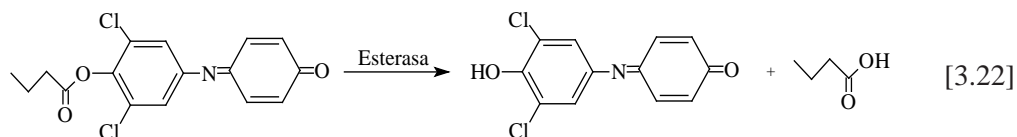
Un método basado en una cascada de amplificación ha sido propuesto para mejorar el límite de detección del ensayo para la fosfatasa alcalina, involucrando la utilización de un sustrato sintético diferente (Eq. 3.21), (oxotri fluorobutil)fenilfosfato:¹¹

10. H.U. Bergmeyer, K. Gawehn y M. Grassl en "Methods of Enzymatic Analysis", H.U. Bergmeyer, Ed., Academic Press, New York, 1974. Vol. 1, p. 496.

11. P.D. Mize, R.A. Hoke, C.P. Linn, J.E. Reardon y T.H. Schulte, *Anal. Biochem.* **179**, 1989, 229-235.



Cuando este sustrato es desfosforilado, su producto actúa como *inhibidor* de una segunda enzima, la esterasa de hígado de conejo. De esta manera, cuando la actividad de la fosfatasa alcalina aumenta, se produce un aumento en la concentración del inhibidor, y por lo tanto una disminución de la actividad de la esterasa. Un segundo sustrato sintético fue preparado para la esterasa (relativamente no selectivo), de modo de que la reacción del indicador se desarrolló según se muestra en la Ecuación 3.22 que se observa a continuación:



El sustrato para la reacción del indicador, dicloroindofenilbutirato (dichloroindophenylbutyrate), es amarillo pálido. El producto de la reacción es azul oscuro, con un máximo de absorbancia a 620 nm. La ingeniosidad de este método reside en la producción de un inhibidor enzimático, (oxotri fluorobutil)fenol, más bien que una especie que se cuantifica directamente. El inhibidor afecta la actividad de la esterasa, dando como resultado la amplificación catalítica de la actividad inicial de la fosfatasa alcalina. El límite de detección del análisis amplificado ha sido informado como de $3,2 \times 10^{-14}$ M, una mejora en el límite de detección de 100 veces respecto al análisis estándar para la fosfatasa alcalina.

3.5.1.2 Fluorescencia.

La utilización de métodos de espectrometría molecular de fluorescencia para la cuantificación de los productos de las reacciones enzimáticas ha dado lugar a límites de detección que son varias órdenes de la magnitud menores que los alcanzados por métodos estándares basados en la medición de absorbancia. A concentraciones bajas de analito, la intensidad de la emisión de fluorescencia es directamente proporcional a la concentración, y su valor depende de dos factores, la absorbancia molar del analito en la longitud de onda de excitación, y de la eficiencia cuántica de fluorescencia para el analito, bajo condiciones de análisis.

Los métodos de fluorescencia son intrínsecamente capaces de detectar concentraciones mucho más bajas del analito, debido a los principios instrumentales implicados. Considere,

III. CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS Y SUS SUBSTRATOS

por ejemplo, una comparación de las intensidades de luz medidas en soluciones blanco por espectrofotómetros y espectrofluorómetros. La radiación incidente pasa a través de la cubeta esencialmente sin sufrir absorción en ambos casos. El detector del espectrofotómetro, sea este un fotodiodo o un tubo fotomultiplicador, medirá una alta intensidad de luz transmitida. La detección de la luz esta relacionada con la llegada de fotones al elemento de detección, un proceso al azar que exhibe una distribución normal (Gaussiana) de acontecimientos por unidad de tiempo, en el que el ruido aumenta en relación como (eventos)^{1/2}. Esto significa que la alta intensidad transmitida por la solución blanco posee un nivel de ruido intrínsecamente alto. Un aumento pequeño en la concentración de la muestra da lugar a una leve disminución de la intensidad de luz transmitida, sobrepuesta a ese nivel intrínsecamente alto del ruido. En contraposición, la emisión de fluorescencia se mide perpendicularmente al rayo de la luz incidente, de modo que solamente la luz emitida llegue al elemento de detección. Debido a esto, una solución blanco generará una señal muy baja en el detector, con un nivel de ruido intrínsecamente bajo. Pequeños aumentos de la concentración son así mucho más fáciles de cuantificar con elevada exactitud.

La detección de la fluorescencia es también intrínsecamente más selectiva que la detección de la absorbancia, puesto que las longitudes de onda de excitación y de emisión pueden ser seleccionadas, de tal manera de adecuarse a las características particulares de un dado producto de la reacción enzimática. Por ejemplo, los análisis que emplean enzimas del tipo de las deshidrogenasas pueden monitorear el cambio de absorbancia del NAD⁺ o NADP⁺ a 340 nm con sensibilidad y selectividad razonables. Sin embargo, si estas coenzimas son excitadas a 340 nm, emitirán luz fluorescente a 460 nm. Las medidas de fluorescencia no solo poseen intrínsecamente límites de detección más bajos, sino que también proporcionan selectividad respecto a potenciales sustancias interferentes, que pueden también absorber a 340 nm pero no emiten a 460 nm.

Las medidas de fluorescencia están sujetas a ciertas dificultades, las más comunes han sido denominadas como “apagamiento” (quenching) y el “efecto de filtro interno” (inner-filter effect). Cualquier compuesto que absorba cerca de la longitud de onda de emisión apagará (absorberá) la luz emitida, por lo tanto reducirá la intensidad observada de emisión. Los polipéptidos y los oligonucleotidos poseen máximos de absorción inferiores a 300 nm, debido a ello no actúan generalmente como apagadores; sin embargo, los grupos prostéticos tales como flavinas, hemos y átomos de metal coordinados apagarán con eficacia la emisión de la fluorescencia en ciertas regiones del espectro visible. Los efectos del filtro interno se deben considerar si la longitud de onda seleccionada para la excitación es absorbida por otras especies en la muestra además del analito, otra vez dando por resultado una intensidad de emisión observada reducida. Los residuos de tirosina y de triptofano presentes en proteínas contribuyen a los efectos del filtro interno para longitudes de onda de excitación cercanas a los 300 nm.

Los principios del apagamiento de la fluorescencia se han aplicado con éxito en el diseño de análisis para detectar la actividad de proteasas. Las proteasas son las enzimas digestivas que degradan los polipéptidos en oligopeptidos más pequeños o sus aminoácidos constitutivos.

Un ensayo¹² general para la actividad de proteasas emplea un sustrato preparado por derivatización covalente de una proteína, transferrina, con un número de marcas de fluoresceína isotiocianato (fluorescein isothiocyanate, FITC). Las proteínas marcadas con FITC (Figura 3.3) exhiben máximos de absorbancia a 495 nm y máximos de emisión a 525 nm.

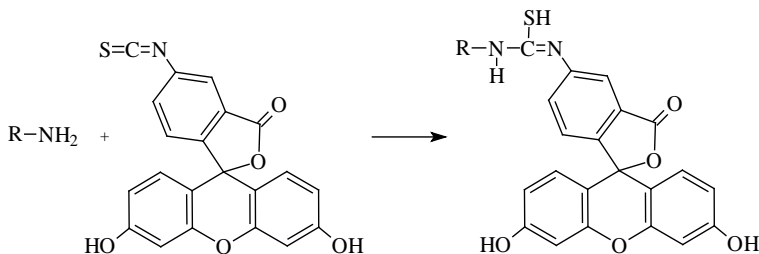


Figura 3.3. Marcando los residuos proteicos de lisina (R-NH₂) con FITC.

Cuando la transferrina se marca con FITC, el átomo de hierro coordinado en el sitio activo actúa como un apagador eficaz de la luz emitida, de modo que este sustrato artificial exhiba baja intensidad de emisión a 525 nm. Luego de la exposición a la proteasa, el polipéptido es degradado, dando como resultado la liberación de los aminoácidos marcados con FITC y de oligopéptidos. Debido a que el fluoróforo y el apagador ya no están próximos, la intensidad de luz emitida aumenta. El análisis por lo tanto implica la medición del aumento de la intensidad de emisión a 525 nm luego de determinado tiempo.

Un segundo análisis para proteasa basado en el apagamiento de fluorescencia fue diseñado para la proteasa de *Astacus*,¹³ una endopeptidasa específica encontrada en el cangrejo de agua dulce que corta la cadena polipeptida entre los residuos de arginina y de alanina. Un sustrato sintético (Figura 3.4) fue preparado ligando un oligopeptido que contenía un residuo fluorescente de triptofano a un grupo dansil terminal, el que es un apagador eficaz de la fluorescencia del triptofano. Observe que el sitio de corte del polipéptido ocurre *entre* el triptofano y el grupo dansil.

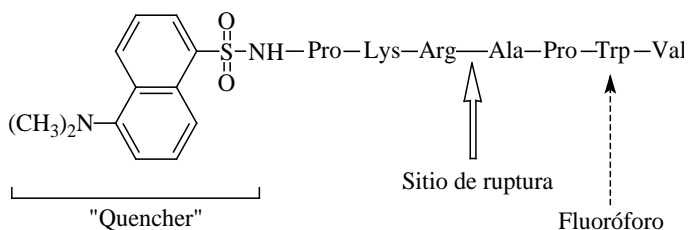


Figura 3.4. Sustrato sintético para ensayar la actividad de proteasa de *Astacus*.

12. K.A. Homer y D. Beighton, *Anal. Biochem.* **191**, 1990, 193-197.

13. W. Stocker, M. Ng y D.S. Auld, *Biochemistry* **29**, 1990, 10418-10425.

El triptofano se excita a 285 nm, y emite a 360 nm. En el sustrato sintético, la fluorescencia del triptofano es apagada por el grupo dansil, mediante un mecanismo de transferencia de energía no radiante; el fluoroforo y el extintor están unidos muy próximos, permitiendo que este proceso ocurra. Luego de la ruptura de la unión Arg-Ala, el producto fluorescente, Ala-Pro-Trp-Val, muestra intensidades mucho más altas de emisión a 360 nm, puesto que el grupo apagador dansil ya no está próximo al grupo fluorescente.

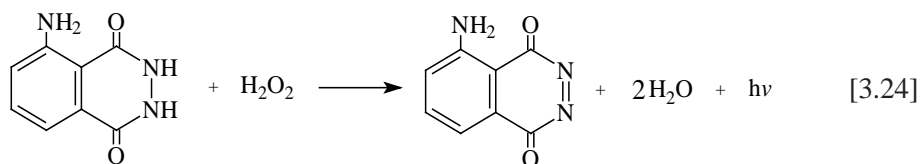
3.5.1.3 Luminiscencia.

Los métodos que utilizan la bioluminiscencia se basan en la producción de luz por una reacción catalizada enzimáticamente. La reacción enzimática rinde un producto que se encuentra en un estado excitado, que regresa a su estado basal mediante la emisión de luz, como puede verse en la Eq. 3.23.



Los métodos basados en bioluminiscencia son distintos a los métodos de absorbancia y de fluorescencia, porque la luz medida ahora es más bien un fenómeno transiente y no de estado estacionario. Debido a esto, las medidas de la velocidad inicial rinden un nivel *constante* de la luz detectada, más bien que los aumentos lineales observados cuando se mide absorbancia o fluorescencia. Puesto que los fotones son un producto de la reacción, se producen en proporción estequiometrica a la cantidad de sustrato consumida. Las medidas de absorbancia y de fluorescencia, por otra parte, producen un flujo constante de fotones a lo largo del tiempo. Por esta razón, las intensidades de luz son mucho más bajas con reacciones de la luminiscencia, y las señales generalmente se integran durante varios minutos para poder obtener niveles aceptables de S/N (señal a ruido). Los requisitos instrumentales para las medidas de luminiscencia son bastante simples: un fotómetro estándar utilizado para la medición de luminiscencia consiste en un detector de luz de alta sensibilidad (contador de fotones, photon counter) que rodea el compartimiento de la muestra, colocado dentro de un recinto que elimine la luz ambiente; no se requiere fuente de luz ni monocromador.

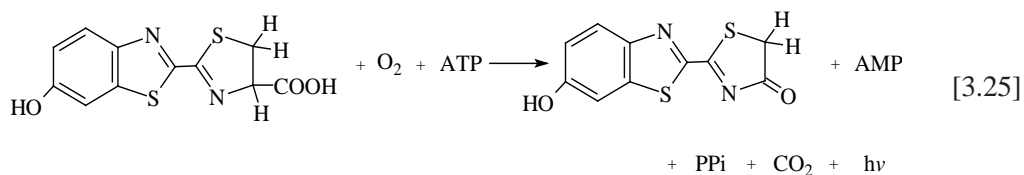
Reacciones primarias que producen peróxido de hidrógeno han sido ensayadas¹⁴ utilizando una reacción indicadora basada en luminol/peroxidasa, Eq. 3.24:



14. B.B. Kim, V.V. Pisarev y A.M. Egorov, *Anal. Biochem.* **199**, 1991, 1-6.

La forma oxidada del luminol es producida en su estado excitado, y la luz emitida se integra en un lapso de cuatro minutos. Cuando esta reacción fue utilizada como reacción indicadora para un análisis de glucosa basado en glucosa oxidasa, se observó linealidad entre 0,1 y 2,0 mM de glucosa, mientras que un análisis del colesterol que usaba la enzima colesterol oxidasa produjo una curva de calibración lineal entre 50 y 100 mg/mL. La sensibilidad de la reacción indicadora, así como la de los dos métodos expuestos, depende fuertemente del tipo particular de peroxidasa usado. La peroxidasa de *Arthromyces* (un hongo) ha sido descrita produciendo curvas de calibración con pendientes 28 veces mayor para el análisis de la glucosa y 134 veces mayor para el colesterol cuando se compara con la peroxidasa de uso más habitual proveniente de rábano picante (horseradish preoxidase).

La luciferaza proveniente de insectos como las luciérnagas¹⁵ puede ser empleada como enzima indicadora para cualquier reacción primaria que produzca ATP. La luciferaza cataliza la descarboxilación oxidativa de la luciferina, de acuerdo a la reacción de la Eq. 3.25:



Esta reacción da lugar a la emisión de luz entre 540 y 600 nm. La luciferaza es activada por el magnesio bivalente, entonces, los experimentos deben realizarse en la presencia de exceso de Mg²⁺ (1 mM). Esta reacción no produce una cantidad constante de luz bajo condiciones de pseudo-primer orden, según lo observa en la Figura 3.5. Esto se piensa puede ser ocasionado por la inhibición por producto de la luciferaza. La Figura 3.5 también muestra el efecto de especies hidrofóbicas y anfipáticas en la producción de luz; estas especies pueden ser cuantificadas por su efecto inhibitorio sobre la reacción de la luciferaza.

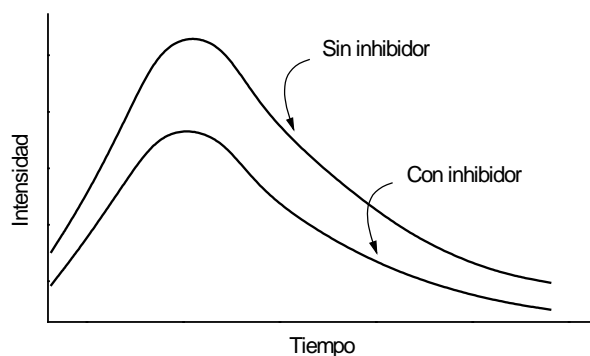


Figura 3.5. Intensidad de luz versus tiempo para la reacción de luciferina/luciferaza.

15. S. Naderi y D.L. Melchior, *Anal. Biochem.* **190**, 1990, 304-308.

La producción de luz se integra sobre un segundo obteniéndose un valor total de emisión que es utilizado para la cuantificación. Esta reacción se ha utilizado para estudiar la partición de anestésicos en las bicapas lipídicas, donde las especies anestésicas que fueron estudiadas actuaban como inhibidores competitivos de la luciferasa.

3.5.1.4 Nefelometria.

La nefelometria, o técnicas de dispersión de la luz (light scattered), puede ser utilizada para estudiar reacciones enzimáticas, cuando la turbidez del medio de reacción cambia mientras que la reacción procede. Si el nivel de turbidez es bajo, la intensidad de luz dispersada es proporcional a la concentración. Instrumentación estándar utilizado en espectrofluorometria es normalmente adecuado para medir la dispersión de la luz, perpendicularmente respecto al rayo de luz incidente. Este método se ha utilizado para cuantificar los lípidos, usando la enzima lipasa.¹⁶ Esta enzima cataliza la hidrólisis de lípidos en sus ácidos grasos constitutivos, que son más solubles que los lípidos en medios acuosos. Por lo tanto, la turbidez de la muestra disminuye mientras que procede la reacción.

3.5.2 Detección electroquímica

3.5.2.1 Amperometria.

Los métodos amperométricos miden la corriente producida en un electrodo de trabajo en respuesta a un potencial aplicado. Los análisis enzimáticos amperométricos se basan en la producción de una especie oxidable o reducible como consecuencia final de la acción de una enzima sobre un sustrato. El potencial aplicado es suficientemente extremo como para oxidar (a potenciales positivos) o reducir (a potenciales negativos) *totalmente* cualquier analito que entre en contacto con el electrodo de trabajo. En soluciones bajo agitación constante o sin agitar, donde la corriente producida esta controlada por el transporte de masa, esta corriente es directamente proporcional a la concentración del analito.

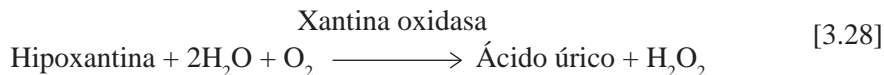
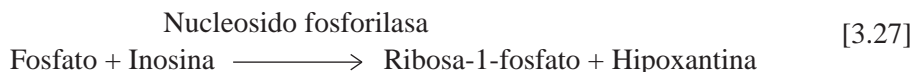
Las técnicas amperometricas son habitualmente utilizadas en los análisis enzimáticos en los cuales el peróxido de hidrógeno es uno de los productos. El peróxido de hidrógeno se oxida a un potencial constante de +700 mV versus SCE (electrodo de calomel saturado) produciendo oxígeno molecular:



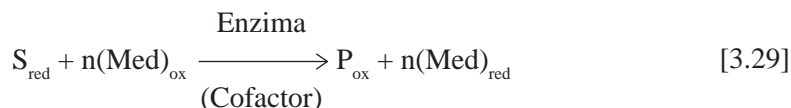
Los electrones producidos en esta reacción de oxidación resultan en una corriente medida que es directamente proporcional a la concentración de H_2O_2 .

16. L. Zinterhofer, S. Wardlow, P. Jatlow y D. Seligson, *Clin. Chim. Acta* **44**, 1973, 173-178.

Detección amperométrica ha sido utilizada para cuantificar fosfato inorgánico¹⁷ en un sistema formado por dos enzimas, como se muestra en las Eqs. 3.27-3.28:



Además de las reacciones que producen peróxido, la amperometría se puede utilizar conjuntamente con una variedad de enzimas del tipo de las oxidasas y deshidrogenasas que emplean *mediadores* de bajo peso molecular, compuestos que pueden aceptar electrones en reemplazo del oxígeno molecular.



Los derivados de ferroceno, el ferricianuro, una variedad de derivados de la quinona y otros oxidantes orgánicos se han utilizado como mediadores de las reacciones catalizadas por oxidasas y deshidrogenasas. Después de su reducción en la solución, estos mediadores son oxidados nuevamente en la superficie de un electrodo de trabajo polarizado a un potencial adecuado, produciendo corrientes mensurables. Se ha demostrado que los mediadores que poseen mayores velocidades de transferencia de electrones en fase heterogénea producen resultados mejores en cuanto a su relación señal/ruido (S/N), cuando se lo compara con la oxidación del peróxido a oxígeno.

3.5.2.2 Potenciometría.

En los métodos potenciométricos existe una relación logarítmica entre el potencial y la concentración del analito. El instrumento más común utilizado para este tipo de mediciones se denomina “pH-Stat”, en el cual un electrodo de vidrio (pH) sigue las reacciones que consuman o produzcan protones. Dado que los cambios de pH alteran la actividad enzimática, el pH es mantenido en un valor constante por la adición de ácido o de base. La velocidad a la cuál adiciona el titulante es entonces proporcional a la velocidad de la reacción enzimática. Mediciones de alta precisión utilizando el pH-Stat requieren la

17. S.D. Haemmerli, A.A. Suleiman y G.G. Guilbault, *Anal. Biochem.* **191**, 1990, 106-109.

utilización de soluciones buffer de baja concentración en la disolución usada para ensayar la enzima.

Otros métodos potenciométricos emplean electrodos sensibles a los gases para NH_3 (útiles para reacciones de deaminasas) y CO_2 (para reacciones de descarboxilasas). Electrodo ión-selectivos también han sido usados para cuantificar penicilina, dado que la reacción catalizada por la penicilasa puede ser mediada con I^- o CN^- .

3.5.2.3 Conductimetria.

Estos métodos implican el uso de un voltaje alterno a través de dos electrodos inmersos en la solución, y la medición de la magnitud de corriente alterna que circula entre los electrodos. Esta corriente es directamente proporcional a la conductividad de la solución, que a la vez es determinada por su fuerza iónica.

La reacción catalizada por la ureasa, en particular, es muy adecuada para ser cuantificada utilizando conductimetria.¹⁸ La urea es hidrolizada por la ureasa de acuerdo a la Eq. 3.31:



En esta reacción, cuatro iones se producen a partir de una única molécula sin carga de sustrato, dando por resultado un aumento significativo de la fuerza iónica. Una buena relación S/N puede alcanzarse si la fuerza iónica inicial (concentración del buffer) del medio en el cual se desarrolla el análisis es baja, en el orden de 5-10 mM.

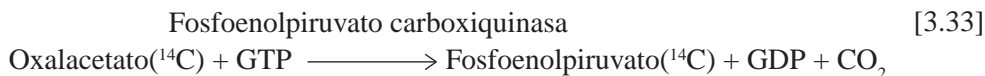
3.5.3 Otros métodos de detección

3.5.3.1 Radioquímicos.

Los métodos radioquímicos están siendo cada vez más reemplazados por otros ensayos que no requieren instalaciones especializadas ni procedimientos complicados de manipulación y descarte del material radioactivo, aunque en algunos casos, el método de opción todavía implica el uso y la cuantificación de especies radioactivas. Algunos ejemplos incluyen los análisis de punto final (end-point) para guanosina-5'-trifosfato (GTP) y guanosina-5'-difosfato (GDP).¹⁹ Estas especies están implicadas en la regulación hormonal, la síntesis y secreción de proteínas, y la gluconeogénesis. El análisis de GTP involucra las reacciones implica las reacciones que se observan en las Eq. 3.32-3.33:

18. P. Duffy, C. Mealet, J.M. Wallach, y J.J. Fombon, *Anal. Chim. Acta* **211**, 1988, 205-211.

19. P.F. Cerpovicz y R.S. Ochs, *Anal. Biochem.* **192**, 1991, 197-202.



Todos los reactivos se agregan en exceso, y la mezcla se equilibra al menos durante 12 horas (overnight) con la muestra que contiene GTP, de modo tal que la cantidad de fosfoenolpiruvato marcado (PEP^(14C)) producido este limitada por la cantidad de GTP presente en la muestra y las constantes de equilibrio de las reacciones enzimáticas involucradas. El PEP marcado luego es separado por cromatografía de intercambio aniónico y cuantificado en un contador de centelleo. El análisis para el GDP se conduce usando las mismas reacciones en el sentido contrario (ambas enzimas son reversibles, y rinden una mezcla en equilibrio de reactivo y de productos), y PEP marcado como reactivo. Esto es seguido por la separación y la cuantificación del aspartato marcado. Es importante notar que todos los análisis enzimáticos radioquímicos requieren un paso de separación antes de proceder a la cuantificación.

3.5.3.2 Manometría.

Los métodos manométricos simples pueden ser utilizados en análisis de punto final, para medir la cantidad total de un gas (tal como NH₃ o CO₂) producido en una reacción enzimática. Los manómetros automatizados se pueden utilizar en modo cinético, para cuantificar la evolución del gas en función de tiempo. Estos métodos se basan en las leyes de los gases ideales, que indican que el volumen ocupado por un gas es directamente proporcional al número de los moles del gas a presión y temperatura constantes. El volumen del gas se mide así en función de tiempo o después de la finalización de la reacción. Los métodos manométricos han sido suplantados en gran parte por técnicas instrumentales más selectivas.

3.5.2.3 Calorimetría.

La calorimetría isotérmica de titulación (ITC) ha sido propuesta recientemente como método general para la determinación de la velocidad de reacciones enzimáticas.²⁰ Este método se basa en la relación entre la energía necesaria para mantener la temperatura constante y el número de moles de sustrato que son transformados en producto. El parámetro medido, la energía, se relacionada con el calor (Q) por diferenciación:

$$\text{Energía} = dQ/dt \quad [3.34]$$

20. M.J. Todd y J. Gomez, *Anal. Biochem.* **296**, 2001, 179-187.

III. CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS Y SUS SUBSTRATOS

El calor es entonces directamente relacionado con el número de moles de sustrato convertidos en producto, con una constante de proporcionalidad igual a ΔH_{app} , la entalpía molar aparente para la reacción, determinada experimentalmente:

$$Q = n \Delta H_{\text{app}} \quad [3.35]$$

Entonces, la energía termal medida para una reacción enzimática se puede relacionar directamente con la velocidad de la reacción enzimática:

$$\text{Velocidad} = (d[P]/dt) = (1/(V \Delta H_{\text{app}}))(dQ/dt), \quad [3.36]$$

donde V es el volumen de la disolución y $[P]$ es la concentración del producto de la reacción.

La sensibilidad de este método se relaciona directamente con la entalpía molar aparente de la reacción, de modo que las reacciones muy endotérmicas o exotérmicas serán más fácilmente medidas. Los ejemplos del uso de este método a la determinación de los parámetros cinéticos de las enzimas incluyen la dihidrofolato reductasa, creatinina fosfoquinasa, hexoquinasa, ureasa, tripsina, la proteasa del HIV-1, heparinasa, y la piruvato carboxilasa.

3.6 Ensayos de ultra alto rendimiento (Ultra-High-Throughput Assays)²¹⁻²³

Los progresos recientes en el diseño de placas miniaturizadas han demostrado que muchas reacciones que se realizan usando las placas convencionales multipozo de 96 pozos se pueden adaptar a las nuevas placas de 384 y 1536 pozos. La motivación para esta capacidad creciente de análisis proviene en gran parte de la industria farmacéutica, donde se realiza la investigación de una gran cantidad de candidatos a compuestos activos producidos por síntesis combinatoria; estas placas miniaturizadas permiten una productividad más alta y una identificación más rápida de los compuestos con mejores probabilidades de convertirse en una droga exitosa. Los desafíos en el desarrollo de análisis de alto rendimiento (HTS, high throughput screening) implican la reducción del volumen del análisis desde 200 (96-pozos) a menos de 1 microlitro (1536-pozos), con los problemas concomitantes del desarrollo de la instrumentación confiable para determinar las señales analíticas de volúmenes de muestra tan pequeños, la evaporación del solvente, y otros. Los análisis basados en la lectura de absorbancia son los más fácilmente adaptables, ya que la longitud de la trayectoria de la luz disminuye solamente en un factor de 2 para las placas 1536 pozos, con respecto a las placas convencionales de 96 pozos. Tales análisis han sido ensayados exitosamente para la fosfatasa, la ATPasa y la beta-lactamasa, así como sus inhibidores, bajo condiciones donde cada uno de los pozos individuales en placas de

1536 pozos había sido llenado totalmente (volumen total 10 microlitros).^{21,22} Estudios para producir placas de 9600 pozos están siendo realizados, para ser empleadas en métodos denominados de ultra alto rendimiento (denominados generalmente ultra-HTS). Un resumen excelente acerca de la instrumentación y robótica aplicada a métodos HTS y ultra-HTS ha sido recientemente publicado.²³

3.7 Consideraciones prácticas para los análisis enzimáticos

En cualquier análisis donde las enzimas están implicadas, debe tenerse cuidado para evitar la desnaturalización y la pérdida de actividad debido a las condiciones incorrectas de manipuleo y de almacenaje. En detalle, las condiciones siguientes deben ser evitadas para la mayoría de las enzimas: las temperaturas superiores a los 40 °C, valores de pH superiores a 9 o menores a 5, y la presencia de solventes orgánicos, surfactantes, y de metales traza. Al ajustar el pH de una solución de la enzima, los ácidos o las bases se deben agregar gota a gota a lo largo de los lados del recipiente, con agitación constante, para evitar la aparición de pH locales extremos.

La actividad enzimática es preservada por conservación en frío. Las proteínas liofilizadas se almacenan congeladas a -20 °C o bien refrigeradas a 5 °C, mientras que las soluciones enzimáticas diluidas se almacenan en heladera a 2-5 °C. Las suspensiones concentradas de enzimas en sulfato de amonio son generalmente estables por períodos largos a 2-5 °C.

Algunas enzimas se fijan por adsorción fuertemente al material de vidrio. Si éste es el caso, las soluciones son preparadas comúnmente en presencia de un gran exceso (unas 100 veces) de una proteína inerte, tal como albúmina, para evitar las pérdidas de la actividad que conducirían a calibraciones erróneas.

Las formas reducidas de las coenzimas de piridina, NADH y NADPH, son sensibles a la luz (pérdida del 20% de la actividad luego de 7 semanas), a la humedad (pérdida del 50% luego de 24 horas) y a las altas temperaturas (pérdida del 10% luego de 3 semanas a 33 °C). Las formas oxidadas de estas coenzimas son más estables, pero también se deben almacenar a baja temperatura. Las coenzimas de flavina son sensibles a la luz, y se deben almacenar en la oscuridad.

Las soluciones buffer se deben preparar bajo condiciones estériles, y almacenar después de ser sometidos a ultrafiltración. Muchos sistemas bioquímicos utilizados como buffer son excelentes medios para el crecimiento microbiano.

21. J.J. Burbaum, *J. Biomol. Screening* **5**, 2000, 5-8.

22. P. Lavery, M.J.B. Brown y A.J. Pope, *J. Biomol. Screening* **6**, 2001, 3-9.

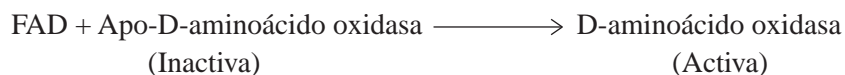
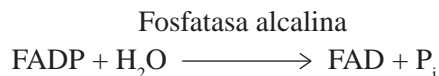
23. D.A. Wells, "High Throughput Bioanalytical Sample Preparation", Elsevier, New York, 2003.

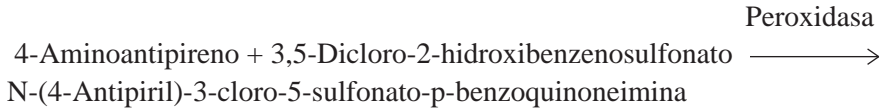
3.8 Lecturas sugeridas

- H. Bergmeyer, Ed. “*Methods of Enzymatic Analysis*”, 3rd Ed., Vols I-XII, VCH Publishers, Weinheim, Germany, 1986.
- R. Eisenthal and M.J. Danson, Eds., “*Enzyme Assays: A Practical Approach*”, Oxford University Press, New York, 1992.
- G.G. Guilbault, “*Enzymatic Methods of Analysis*”, Pergamon Press, New York, 1970.

3.9. Problemas

1. ¿En qué tipo de análisis de sustrato, el cinético o el de punto final, es necesario mantener la concentración de sustrato / analito en niveles bien menores al K_m de la enzima utilizada?
2. Considere un análisis cinético basado en la lectura directa de la absorbancia, en el cual un sustrato que no absorbe se convierte por medio de un proceso enzimático en un producto absorbente. ¿En qué rango de concentración del sustrato se puede utilizar el análisis para cuantificar el sustrato? ¿En que rango de concentración del sustrato se puede utilizar el análisis para cuantificar actividad enzimática?
3. Las reacciones con indicador se emplean en serie con una reacción enzimática para generar un producto que pueda ser medido fácilmente. ¿Usted esperaría que los límites de detección fueran mejores (más bajos) si la reacción del indicador genera un fluoroforo directamente, o si la reacción del indicador produce una especie que inhiba una reacción enzimática adicional que produce un fluoroforo?
4. Un nuevo análisis se ha divulgado recientemente para la enzima fosfatasa alcalina. Las reacciones sobre las cuales se basa el análisis se muestran abajo:

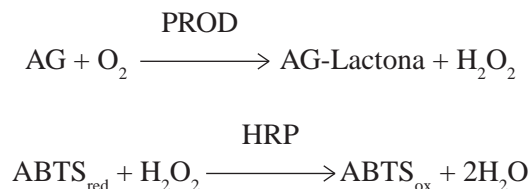




El producto de la cuarta reacción absorbe fuertemente a 520 nm, con una absorptividad molar de $2,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Luego de una incubación de 10 minutos, 100 amol ($1 \text{ amol} = 10^{-18} \text{ mol}$) de fosfatasa alcalina en un volumen total de 0,100 mL hidroliza 0,1 mM de FADP (0,5% de la concentración (saturante) inicial de sustrato, 20 mM), y transforma 12% de la apo-D-aminoácido oxidasa presente originalmente (100 nm) en la holoenzima activa.

- ¿Cuáles de las cuatro reacciones mostradas arriba es/son crítica/s para el análisis de la fosfatasa alcalina? ¿Cuáles son las reacciones indicadoras que podrían ser substitutas por otras?
- Calcule la concentración de fosfatasa alcalina en I.U./mL.
- Dado que el k_{cat} para D-aminoácido oxidasa sea de $3,6 \text{ s}^{-1}$, y asumiendo que todos los sustratos estén presentes en exceso, calcule el cambio de absorbancia que debería ocurrir si están presentes en el volumen de reacción 12 nM de holo-D-aminoácido oxidasa en un periodo de 10 minutos.
- Si consideramos que el cambio medido en la absorbancia durante el ensayo es la mitad del valor calculado en (c) (puesto que la holoenzima se genera de una manera lineal respecto al tiempo durante el período de incubación de 10 minutos), calcule el rango de concentraciones en el cual la fosfatasa alcalina podría ser cuantificada. Asuma que los valores finales de la absorbancia deben estar entre 0,1 y 2,0 unidades de absorbancia; informe el rango de concentración de la fosfatasa alcalina en I.U./mL.

5. El 1,5-Anhidro-D-glucitol (AG, 164 g/mol) es el principal azúcar alcohol presente en el líquido cerebroespinal humano y sangre. En el plasma, el nivel normal de AG es de $24,6 \pm 7,2 \text{ mg/L}$ (539 pacientes estudiados), mientras que los pacientes afectados de diabetes mellitus mostraron niveles reducidos de AG, su valores fueron $7,3 \pm 7,1 \text{ mg/L}$ (808 pacientes estudiados). Debido a que los niveles reducidos de AG son indicadores específicos de este tipo de diabetes, un análisis diagnóstico enzimático para AG ha sido desarrollado. El análisis emplea las enzimas piranosa oxidasa (PROD) y la peroxidasa de rábano picante (HRP) de acuerdo al esquema siguiente de reacción:



III. CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS Y SUS SUBSTRATOS

La forma oxidada de ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) exhibe un máximo de absorbancia a 420 nm, con una absortividad molar de $3,48 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. El análisis de AG fue desarrollado como análisis de punto final, confiando en la conversión completa del sustrato en producto en un período de una hora a 37 °C y pH 5,9, ya que este es el pH óptimo para el sistema completo. La actividad específica de PROD a este pH es 2,11 I.U./mg.

Una muestra de plasma de un paciente sospechado de tener diabetes mellitus fue diluida diez veces durante la adición reactivos y preparación de la muestra, luego incubada una hora a 37 °C . Durante este tiempo, el O₂, PROD, ABTS_{red}, y HRP estaban presentes en exceso para asegurar la conversión completa de niveles normales de AG. Después de la incubación, la absorbancia de la solución resultante fue medida en una cubeta de 1 cm de paso óptico y a 420 nm, midiéndose una absorbancia de $A = 0,174$. ¿Es el paciente diabético?

CAPITULO 4

ENZIMAS INMOVILIZADAS

4.1 Introducción

En la mayoría de los ensayos que utilizan enzimas, tanto para medir una gran variedad de sustratos o actividad enzimática, las enzimas se encuentran en solución. Una gran variedad de instrumentación especializada, incluyendo sistemas robotizados para dispensar distintos reactivos y medición han sido diseñados. Sin embargo, varias desventajas existen para el uso analítico de enzimas solubles con el objetivo de medir sus sustratos. Uno de ellos es que enzimas en solución no pueden ser rehusadas o recicladas, a menos que su muy alto costo justifique algún proceso de repurificación. Además, la actividad de las enzimas solubles disminuye significativamente en el tiempo, por lo que deben ser reemplazadas frecuentemente.

Por estas razones, muchos ensayos han sido adaptados para utilizar enzimas inmovilizadas. Las enzimas son usualmente inmovilizadas mediante la incorporación sobre o dentro de una fase estacionaria dentro de un sistema de flujo; el sustrato llega hasta la enzima disuelto en la fase móvil, generalmente un buffer adecuado. El sustrato es transformado en producto cuando la fase móvil fluye a través de una columna conteniendo la enzima inmovilizada. Un detector a la salida de la columna permite la cuantificación del producto en la fase móvil.

Los denominados reactores enzimáticos, básicamente columnas conteniendo enzima inmovilizada en una fase estacionaria, pueden ser reutilizados muchas veces, a menudo durante varios meses. Ensayos empleando reactores enzimáticos son fácilmente automatizables utilizando sistemas robotizados y programas (software) originalmente diseñados para automatizar sistemas de HPLC. Otra ventaja es que la estabilidad de las enzimas inmovilizadas respecto al tiempo, pH, temperatura y otros factores desnaturizantes es casi siempre mayor que para las mismas enzimas en forma soluble, debido a efectos del ambiente local en el que las enzimas están inmovilizadas. Por estas razones, los ensayos que emplean reactores con enzimas inmovilizadas para la determinación de sustratos son preferidos respecto a aquellos que emplean enzimas solubles.

4.2 Métodos de inmovilización

Los métodos para inmovilizar enzimas son clasificados como químicos o físicos. Los métodos químicos involucran la formación de enlaces covalentes entre los grupos funcionales del material soporte (también llamado matriz o carrier) y los grupos funcionales de la enzima. Los métodos químicos son a su vez subclasificados como métodos no-polimerizantes o polimerizantes. Los no-polimerizantes involucran la formación de enlaces covalentes solo entre la enzima y el soporte, pero no entre moléculas individuales de enzima, mientras que los métodos polimerizantes permiten la formación de ambos tipos de enlaces covalentes, enzima-soporte y enzima-enzima. Los métodos de inmovilización químicos pueden ser representados mediante las ilustraciones de las Figuras 4.1A y B.

Los métodos de inmovilización físicos no involucran la formación de uniones covalentes con la enzima, de tal manera que la composición nativa de la enzima permanece inalterada. Estos métodos son subclasificados en adsorción, inclusión y encapsulación. La adsorción de proteínas sobre la superficie de un soporte sólido es en principio reversible, aunque una cuidadosa selección del material soporte y las condiciones de inmovilización pueden favorecer una desorción o lavado poco evidente, prolongando la vida útil de la columna. La inclusión de enzimas dentro de un polímero se realiza llevando a cabo la polimerización en presencia de enzima; esta termina atrapada en los espacios intersticiales de la matriz polimérica. Mediante el proceso de encapsulación, regiones con alta concentración de enzima resultan separadas del solvente por una membrana semipermeable; esta membrana puede ser atravesada por el sustrato, pero no así por la enzima (debido a su mayor peso molecular). Los métodos físicos de inmovilización se encuentran representados en las Figuras 4.1 C, D y E.

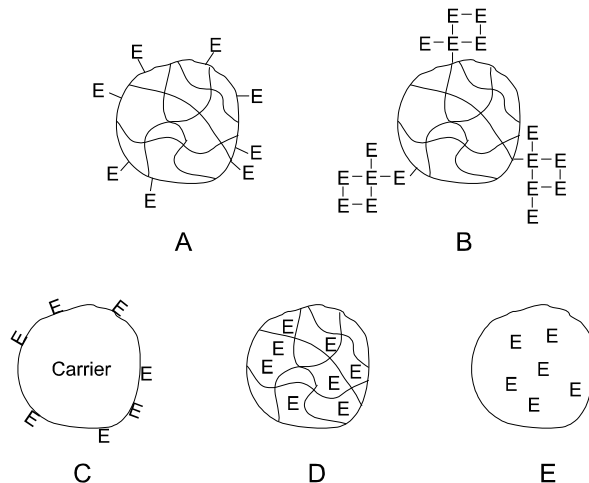


Figura 4.1. Métodos para inmovilizar enzimas. (A) No-polimerizante; (B) Entrecruzado; (C) Adsorción; (D) Atrapamiento; y (E) Encapsulación.

Las secciones siguientes consideraran cada uno de los métodos de inmovilización en detalle.

4.2.1 Inmovilización covalente sin polimerización

Los métodos de inmovilización covalente requieren de la presencia de grupos funcionales en la enzima, así como en el material soporte, necesarios para la formación de uniones covalentes estables. Por esta razón, la elección del material soporte es crucial, ya que determina las reacciones químicas que serán necesarias y la estabilidad de las uniones covalentes que se formaran con la enzima. Estos materiales soportes habitualmente deben ser activados en condiciones extremas, con el objetivo de transformar grupos funcionales relativamente no-reactivos en otros de mayor reactividad química. Estos grupos activados deberán reaccionar rápidamente con proteínas en condiciones suaves de temperatura, fuerza iónica y pH. En la Tabla 4.1 pueden observarse una lista representativa de los materiales soporte sobre los que se han inmovilizado diferentes enzimas, y muestra los grupos funcionales reactivos presentes en el material soporte que pueden ser utilizados para la reacción

Grupo funcional	Material soporte utilizado
-Si(OH) ₃	Vidrio de poro controlado
-CONH ₂	Poliacrilamida
-COOH	Ácido poliacrílico
	Ácido poliaspártico
	Ácido poliglutámico
	Carboximetilcelulosa
R-COO-CO-R'	Copolimero anhídrido maleico/etilénico
-NH ₂	Poliestireno (nitrado y reducido)
	Nylon (luego de tratamiento en HCl)
-OH	Celulosa
	Sephadex
	Agarosa
	Sepharose
	Carboximetilcelulosa

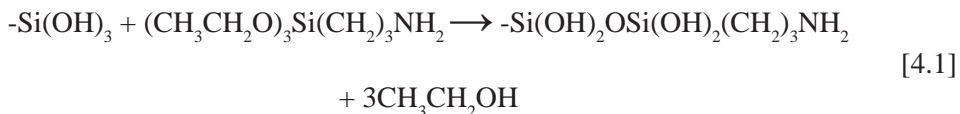
Tabla 4.1. Materiales soporte representativos usados para la inmovilización de enzimas.

Los residuos aminoacídicos, constituyentes de la parte polipeptídica de la enzima, proveen sitios en los que las uniones covalentes con el soporte pueden ocurrir. Los grupos funcionales presentes en las cadenas laterales incluyen aminas primarias (lisina), hidroxilos fenolicos (tirosina) ácidos carboxílicos (aspártico, glutámico), tioles (cisteína), hidroxilos

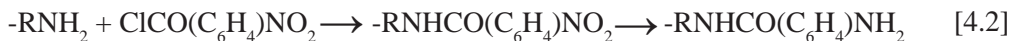
(serina, treonina), y nitrógenos imidazólicos (histidina). De estos, las aminas primarias, ácidos carboxílicos e hidroxilos son los más comúnmente usados para inmovilizar proteínas, debido a que su carácter hidrofílico sugiere que las uniones covalentes ocurrirán en una área accesible de la proteína, en la interfase acuosa, una zona fácilmente disponible para reacciones químicas. Que la reacción química ocurra en condiciones suaves es esencial para evitar la modificación de residuos aminoácidos cercanos al sitio activo de la enzima, así como algún cambio en la estructura terciaria que pueda afectar la actividad catalítica. Algunas veces es posible incluir durante la reacción de inmovilización un análogo no metabolizable del sustrato, o un inhibidor competitivo, para proteger el sitio activo de la enzima de los reactivos químicos usados en el proceso.

4.2.1.1 Cuentas de vidrio de poro controlado.

Los grupos silanol en la superficie del vidrio proveen sitios donde la silanización puede ocurrir. Este proceso puede ocurrir efectivamente en una solución acuosa al 5% de aminopropiltri(etoxi)silano (APTES),¹ lo que resulta en la provisión de grupos amino primarios más reactivos que luego pueden ser derivatizados:

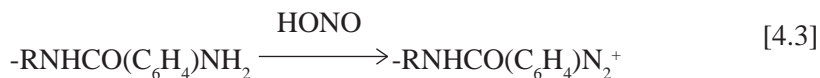


Debido a que los grupos amino primarios son razonablemente reactivos como nucleófilos, un número de reacciones pueden seguir a este paso inicial de activación. Agentes deshidratantes, como las cabodiimidias hidrosolubles pueden ser usados para activar los grupos carboxílicos de la proteína. Estos grupos carboxílicos se convierten en el intermediario *O*-acilisourea en condiciones suaves (pH 7), permitiendo la formación de uniones amida con el vidrio previamente derivatizado con APTES.² Si esta reacción se lleva a cabo en presencia de *N*-hidroxisuccinimida sulfonatada, esta reacción resulta altamente específica para grupos amino primarios, pero aún así el grado de entrecruzado de las proteínas es significativo. Para una inmovilización más selectiva, en la que se evite la polimerización de las proteínas, mayores modificaciones de la superficie son necesarias. La exposición a *p*-nitrobenzoílo cloruro resulta en la adición del grupo nitrofenilo, el que entonces puede ser reducido dando lugar al grupo aminofenilo (Eq. 4.2):

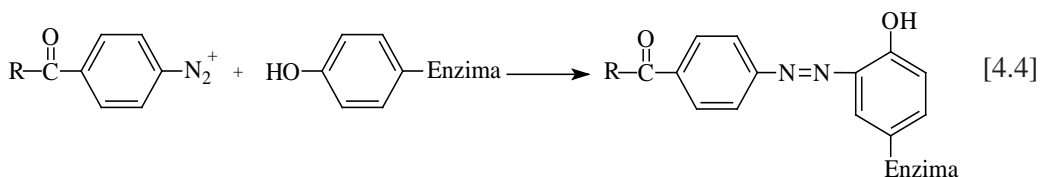


1. S.G. Caravajal, D.E. Leyden, G.R. Quinting y G.E. Marciel, *Anal. Chem.* 60, 1988, 1766-1786.
2. W.F. Line, A. Kwong y H.H. Weetall, *Biochim. Biophys. Acta* 242, 1971, 194-202.

Se requiere un paso final de activación, que es la conversión del grupo aminofenilo en la sal de diazonio:



La sal de diazonio es fácilmente preparada partiendo del grupo aminofenilo, no obteniéndose cuando una amina alifática es tratada con ácido nitroso (como por ejemplo la superficie derivatizada con APTES). La superficie activada ahora esta lista para la unión con la enzima, dado que las sales de diazonio son muy reactivas hacia los residuos de tirosina presentes en proteínas³ (Eq. 4.4):



A pesar de que cuatro pasos de activación son requeridos antes de proceder con la inmovilización de la enzima, este método posee dos importantes ventajas; la unión a la proteína es altamente selectiva, ya que solo se formarán uniones al nivel de los residuos de tirosina, y además se evita el entrecruzado de las enzimas que generalmente resulta en pérdida de actividad enzimática.⁴

4.2.1.2 Polisacáridos.

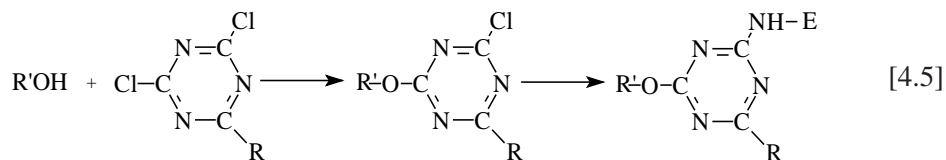
Estos compuestos poseen grupos oxidrilo fácilmente accesibles, y que pueden ser derivatizados para lograr inmovilizar proteínas selectivamente. Consideraremos dos de los métodos más comúnmente utilizados, las reacciones de la triazina y la del bromo cianuro.

El método de la triazina⁵ se basa en la reacción de los oxidrilos del polisacárido con una triazina sustituida, para formar un derivado que es reactivo hacia los grupos amino primario de los residuos de lisina presentes en la enzima (Eq. 4.5). El grupo R sobre la triazina puede ser $-\text{Cl}$ (cianurilo cloruro), OCH_2COOH , NHCH_2COOH , o NH_2 . El paso de activación se realiza generalmente en solvente orgánico, mientras que la reacción con la enzima se realiza en condiciones suaves y en solución acuosa.

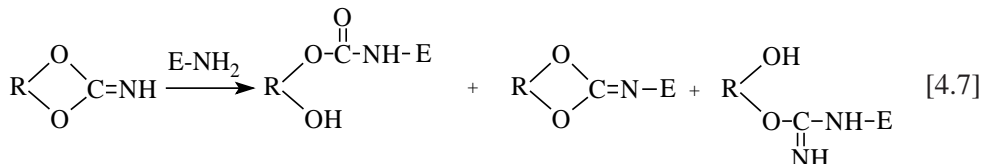
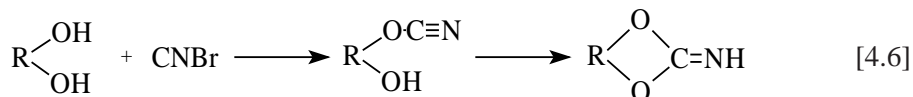
3. H.H. Weetall, *Nature* **223**, 1969, 959-960.

4. E.C. Hatchikian y P. Monsan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**, 1980, 1091-1096.

5. S. Y. Shimizu y H.M. Lenhoff, *J. Solid Phase Biochem.* **4**, 1979, 75-94.



El método del bromo cianuro⁶ no es tan eficiente como el previamente descrito, debido a que reacciones secundarias desactivan algunos de los grupos funcionales activados; de todos modos, este procedimiento se utiliza para preparar grandes cantidades de derivados de polisacáridos, disponibles comercialmente. De esta manera, los usuarios pueden inmovilizar de manera reproducible preparaciones enzimáticas sin realizar los pasos de activación. Este método también emplea los grupos oxidrilo del polisacárido, donde la reacción con bromo cianuro produce un derivado que se reorganiza dando lugar a un grupo reactivo, imidocarbonato, el que reacciona selectivamente con los grupos amino primarios de la lisina. (Eq. 4.6 and 4.7):



Una reacción secundaria que desactiva la superficie involucra la hidrólisis del grupo cianato, formando un grupo carbamato no reactivo en la superficie del polisacárido (Eq. 4.8):



Luego de la reacción inicial del polisacárido con bromo cianuro, el material debe ser guardado en ambiente seco, para evitar las reacciones que desactivan los grupos imidocarbonatos. Celulosa y sephadex tratados con bromo cianuro son comercializados por varias compañías; la exposición de estos materiales a soluciones enzimáticas en condiciones suaves resulta en la unión covalente de las enzimas al material sin entrecruzamiento

4.2.1.3 Poliacrilamida.

Este polímero posee grupos amida libres que pueden ser substituidos con aminas primarias en las condiciones adecuadas, esto es, cuando una gran cantidad de aminas primarias están disponibles. Por ejemplo, cuando se la hace reaccionar con etilendiamina, se generan grupos amina primarios libres:⁷

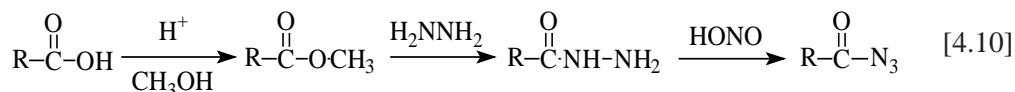


Bajo condiciones extremas, los grupos amina libres pueden ser activados mediante diazotización, y luego, en condiciones de reacción suaves, unirse a los residuos de tirosina de una proteína, inmovilizando la misma sobre el polímero modificado.

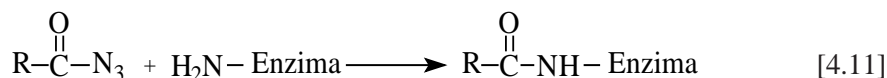
4.2.1.4 Soportes con funciones ácidas.

Tres métodos para inmovilizar enzimas sobre soportes que contienen grupos carboxílicos serán considerados aquí. Todos ellos resultan de la formación de uniones amida con los residuos de lisina presenten en la proteína, mientras que la selectividad hacia la lisina varia dependiendo del método específico usado.

En el método del acil azida,⁸ el grupo carboxílico es secuencialmente convertido en el correspondiente metil ester, acil hidracida y acil azida (Eq. 4.10):



El grupo acil azida puede sufrir ataque nucleofílico, y es principalmente reactivo hacia grupos amino primarios (lisina), pero además reacciona con el grupo oxidrilo presente en los residuos de tirosina y serina, así como con el grupo sulfidrilo de la cisteína (Eq. 4.11):



Woodward's Reactivo K⁹ es un agente deshidratante, soluble en agua, que activa los grupos carboxílicos, de tal manera que son más susceptibles de ser atacados nucleofílicamente. Este reactivo puede ser utilizado en condiciones suaves y medio acuoso, donde los

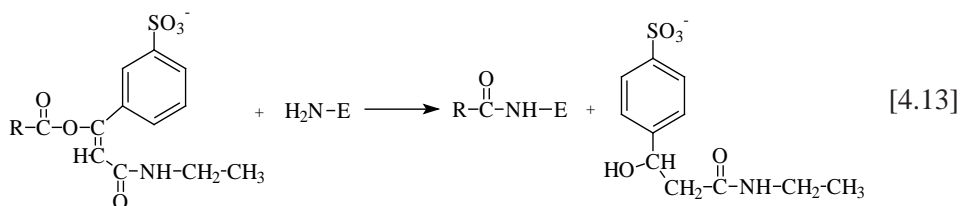
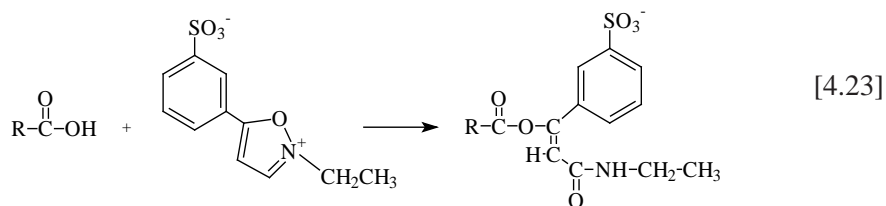
7. J.K. Inman y H.M. Dintzis, *Biochemistry* **8**, 1969, 4074-4082.

8. P.R. Coulet, R. Sternberg y D. R. Thevenot, *Biochim. Biophys. Acta* **612**, 1980, 317-327.

9. R.P. Patel, D.V. Lopiedes, S.P. Brown y S. Price, *Biopolymers* **5**, 1967, 577-582.

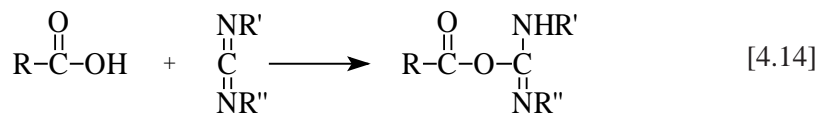
IV. ENZIMAS INMOVILIZADAS

pasos de activación pegado son realizados secuencialmente, para evitar entrecruzamiento entre moléculas enzimáticas (Eq. 4.12 y 4.13):

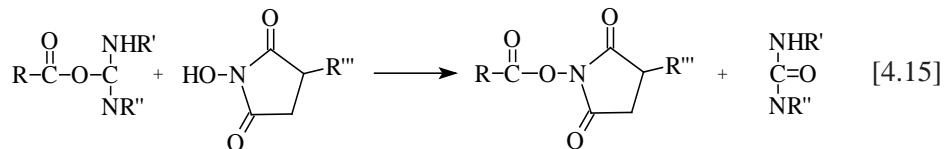


Si no se espera que ocurra entrecruzamiento, el reactivo K de Woodward puede ser incluido con la preparación enzimática, de tal manera de realizar la inmovilización en una única etapa.

Reactivos deshidratantes como la carbodiimida¹⁰ activan los grupos carboxílicos, haciéndolos más proclives al ataque nucleofílico, mediante la formación de *O*-acilisourea como intermediario (Eq. 4.14):



El intermediario es reactivo hacia lisina, tirosina, cisteína, serina y metionina, resultando en la formación de enlaces amida, ester y tioéster. La selectividad de esta reacción puede ser mejorada por la adición de *N*-hidroxisuccinimida durante el paso de activación, resultando en la formación de *N*-hidroxisuccinimida ester (Eq. 4.15):

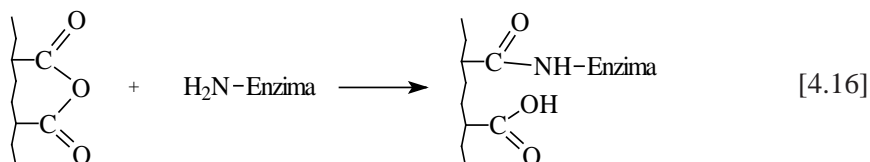


Este ester (NHS) requiere un nucleófilo muy fuerte para ser desplazado, como por ejemplo un grupo amino primario, y es selectivo, dando lugar a la formación de uniones amida con los residuos de lisina.

10. K.L. Carraway y D.E. Koshland, Jr. *Methods Enzymol.* **25**, 1972, 616-623.

4.2.1.5 Grupos Anhídrido.

Los grupos anhídrido presentes en materiales comerciales, como los copolímeros de anhídrido maleico y etilénico, reaccionan directamente con residuos proteicos nucleofílicos presentes en las proteínas.¹¹ Estos grupos reaccionan directamente con residuos de lisina, formando uniones amida (4.16):



4.2.1.6 Grupos Tiol.

Los grupos tiol pueden ser generados en la superficie de un material polimérico,¹² permitiendo la unión química irreversible de enzimas, mediante un proceso redox que involucra la formación de uniones disulfuro con los residuos de cisteína:



Considerado esta reacción, la subsiguiente adición de un agente reductor de grupos disulfuro, tal como mercaptoetanol o ditiotreitól permite la recuperación de la enzima inmovilizada.

La tabla 4.2 resume las reacciones de inmovilización y sus selectividades, discutidas en la Sección 4.2.1.

Método	Residuos de aminoácidos modificados
Diazotización	Lys, His, Tyr, Arg, Cys
Triazina	Lys
Bromuro de cianógeno	Lys
Acil azida	Lys, Tyr, Cys, Ser
Carbodiimida	Lys, Tyr, Cys, Ser, Met
Carbodiimida+NHS	Lys
Anhídrido	Lys
Disulfuro	Cys

Tabla 4.2. Selectividad de distintos métodos de inmovilización.

11. R.A. Zingaro y M. Uziel, *Biochim. Biophys. Acta* **213**, 1970, 371-379.

12. G.P. Royer, S. Ikeda y K. Aso, *FEBS Lett.* **80**, 1977, 89-94.

4.2.2 Entrecruzamiento con reactivos bifuncionales

Reactivos que entrecruzan covalentemente las enzimas son utilizados cuando la enzima se encuentra disponible en grandes cantidades, y la pérdida de un alto porcentaje de la actividad inicial puede ser aceptable. El entrecruzamiento resulta habitualmente en una gran cantidad de enzima inmovilizada, ya que se forman uniones entre las moléculas de enzima y entre estas y el material de soporte. Sin embargo, la pérdida de actividad en este proceso de inmovilización es generalmente elevada, dependiendo del grado de entrecruzamiento; esto es debido a que estas uniones pueden involucrar el sitio activo de las enzimas, a que la difusión del sustrato hacia la enzima se vea dificultada, o inclusive a que las uniones covalentes distorsionen la estructura terciaria de la proteína. Inmovilizaciones utilizando este método son muy populares, debido a que el proceso es rápido y simple.

Los reactivos utilizados para el entrecruzamiento tienen dos grupos funcionales reactivos, separados por un grupo o cadena no reactiva, denominada generalmente separador (spacer group). Los grupos reactivos pueden ser idénticos, como por ejemplo en el glutaraldehído ($\text{OHC}-(\text{CH}_2)_3-\text{CHO}$), en este caso se lo denomina reactivo homobifuncional. Si los grupos reactivos son diferentes, el reactivo se clasifica como un entrecruzante heterobifuncional.

Entrecruzantes homobifuncionales de uso común son presentados en la Figura 4.2. Ellos incluyen glutaraldehído,¹³ reactivo selectivo para aminas primarias, que forma uniones imida que pueden luego ser reducidos a aminas secundarias mediante reducción con borohidruro; diazoencidina¹⁴ es reactiva hacia residuos de tirosina, pero también reacciona con el nitrógeno de histidina y lisina; hexametileno-bis (yodoacetamida),¹⁵ es selectivo para los grupos amino de la lisina, reaccionando mediante sustitución nucleofílica del yodo; y bis(N-hidroxysuccinimidil)ditioldipropionato,¹⁶ selectivo para los grupos amino de lisina, y además es un reactivo que permite el entrecruzamiento reversible, dado que el grupo disulfuro puede ser quebrado mediante la utilización de agentes reductores.

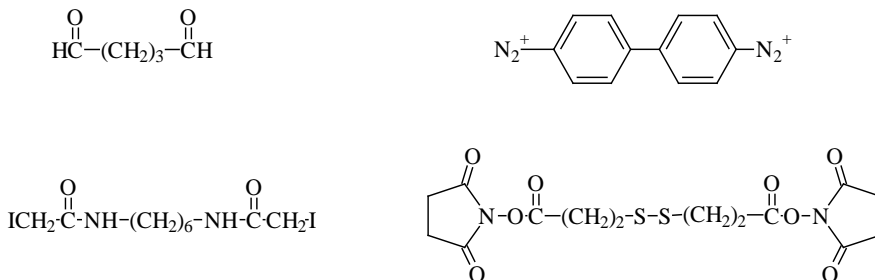


Figura 4.2. Reactivos entrecruzantes homobifuncionales.

13. A.F.S.A. Habeeb y R. Hiramoto, *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 1968, 16-26.

14. I.H. Silman, M. Albu-Weissenberg y E. Katchalski, *Biopolymers* **4**, 1966, 441-448.

15. H. Ozawa, *J. Biochem.* **62**, 1967, 531-536.

16. A.J. Lomant y G. Fairbanks, *J. Mol. Biol.* **104**, 1976, 243-261.

Reactivos bifuncionales son menos usados para entrecruzar enzimas. Una ventaja de estos reactivos es que proveen un nivel adicional de selectividad, debido a la diferente reactividad de los grupos funcionales. Algunos reactivos bifuncionales comercialmente disponibles pueden observarse en la Figura 4.3. Reactivos con grupos isocianato e isotiocianato son selectivos hacia aminas primarias, donde el grupo isocianato es reactivo a temperatura ambiente, mientras que el grupo isotiocianato reacciona a altas temperatura, formando ureas substituidas y tioureas, respectivamente.¹⁷ Reactivos que poseen grupos maleimido son selectivos hacia tioles, mientras que grupos N-hidroxisuccimida ester reaccionan con aminas primarias.¹⁸



Figura 4.3. Reactivos entrecruzantes heterofuncionales.

4.2.3 Adsorción

Adsorción es el método más sencillo para inmovilizar enzimas. Para ello, una preparación enzimática es incubada junto con el material adsorbente por varias horas, luego el adsorbente es retirado de la solución, y lavado con buffer para remover la enzima no adsorbida. Algunos materiales adsorbentes de uso habitual¹⁹ incluyen alumina, carbón, carbono, resinas de intercambio iónico, arcillas, colágeno, metales y vidrio. Las interacciones involucradas en el proceso pueden ser iónicas, polares o por puentes de hidrógeno, o bien involucrar interacciones hidrofóbicas o aromáticas. Todas estas interacciones son en principio no-covalentes, y también en principio, reversibles. Cuando este método de inmovilización es usado, el grado de actividad de la enzima inmovilizada no está directamente relacionada con la cantidad de proteína adsorbida, debido a que cambios drásticos en la conformación de las enzimas pueden ocurrir, lo que causa una significativa pérdida de actividad.

Para aplicaciones prácticas, se requiere que la adsorción sea básicamente irreversible, de otro modo la enzima se pierde hacia la solución en la que se encuentra inmersa, lo que resulta en una pérdida de actividad. Las condiciones óptimas para la inmovilización se

17. Y.K. Cho y J.E. Bailey, *Biotechnol. Bioeng.* **21**, 1979, 461-476.

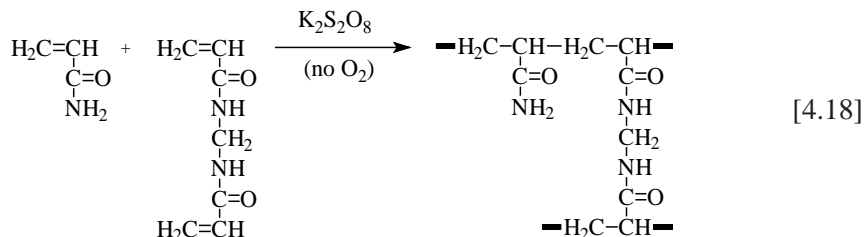
18. E. Ishikawa, S. Hashida, T. Kohno y K. Tanaka in “*Nonisotopic Immunoassay*”, T.T. Ngo, Ed., Plenum Press, New York, 1988. pp. 27-55.

19. A. Rosevear, J.F. Kennedy y J.M.S. Cabral, “*Immobilized Enzymes and Cells*”, IOP Publishing, Philadelphia, 1987. pp. 83-97.

determinan mayoritariamente empíricamente, variando pH, temperatura, fuerza iónica, así como la proporción entre proteína y adsorbente. La estabilidad de la unión de las enzimas es además influenciada por el sustrato enzimático, debido a que altas concentraciones de sustrato producen cambios conformacionales que pueden disminuir la interacción entre la enzima y el material adsorbente.

4.2.4 Inclusión

La inclusión, también llamada oclusión o inmovilización en geles, involucra la formación de una red polimérica altamente entrecruzada en presencia de la enzima, de tal manera de que es atrapada en los espacios intersticiales. Especies de pequeño tamaño, como sustratos y productos, pueden difundir libremente desde el seno de la solución a través de la red polimérica, mientras el gran tamaño de las enzimas previene su liberación hacia el medio externo. El material polimérico más comúnmente utilizado es el gel de poli(acrilamida),²⁰ que se forma por entrecruzamiento de acrilamida con N,N'-hexametilendi(acrilamida) en presencia de persulfato de amonio y en ausencia de oxígeno, como se muestra a continuación (Eq. 4.18):



La resultante poli(acrilamida) entrecruzada posee características que son determinadas por la cantidad de monómero y entrecruzante utilizados. La relación dada por [monómero]/[entrecruzante] determina el tamaño de poro en el cual la enzima es atrapada. La cantidad total usada [monómero]+[entrecruzante] determina las propiedades mecánicas del gel, tal como estabilidad y rigidez.

Por ejemplo, la enzima colinesterasa puede ser atrapada en un gel preparado utilizando 5% de entrecruzante y 15% de monómero en solución acuosa.²¹ Bajo estas condiciones, 56% de la actividad enzimática total fue retenida. Cuando se emplea una concentración más elevada de [monómero]+[entrecruzante], la enzima se desnaturaliza, mientras que mayores concentraciones de entrecruzante da lugar a menos enzima atrapada en el gel.

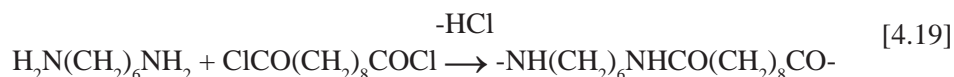
20. M.D. Trevan y S. Grover, *Trans. Biochem. Soc.* **7**, 1979, 28-30.

21. Y. Degani y T. Miron, *Biochim. Biophys. Acta* **212**, 1970, 362-364.

4.2.5 Microencapsulación

Las enzimas pueden ser inmovilizadas por encapsulación en microcapsulas no permanentes, como por ejemplo liposomas, o bien en sistemas permanentes, nylon u otros materiales sintéticos. La enzima es separada del medio externo por una membrana semipermeable, que puede ser atravesada libremente por moléculas pequeñas, como son generalmente sustratos y productos. Mientras que los sistemas no permanentes son útiles en investigación bioquímica, sólo los sistemas de encapsulación permanente pueden ser utilizados para el desarrollo de métodos bioanalíticos, gracias a su estabilidad mecánica.

Microcapsulas de nylon pueden ser formadas por polimerización interfacial de hexametilendiácridamida con sebacoílo dicloruro.²² La hexametilendiácridamida esta inicialmente presente en una solución acuosa de la enzima, mientras que el sebacoílo dicloruro esta presente en una fase orgánica, tal como hexano:cloroformo en relación 4:1. Las dos soluciones se mezclan para formar una emulsión, donde la membrana de nylon-6,10 se formará en la interfase alrededor de las gotitas emulsificadas:



Luego de un tiempo prudencial, las microcapsulas son lavadas y transferidas a una solución acuosa conteniendo algún surfactante soluble en agua, con el objetivo de prevenir agregación. Este método de inmovilización requiere que la concentración de proteína en la fase acuosa sea elevada (del orden de los 10 mg/mL), resultando en una elevada presión osmótica que previene el colapso de las microcapsulas, y además actúa como emulsificante. Las partículas obtenidas son esféricas, con diámetros que varían entre los 2 µm hasta varios milímetros, mientras que el tamaño de poro en la membrana es del orden de los nanómetros.

4.3 Propiedades de las enzimas inmovilizadas

El comportamiento de las enzimas inmovilizadas es diferente al de las mismas enzimas en solución, debido a los efectos del material soporte, o la matriz en la que se encuentra inmovilizada, así como por cambios conformacionales que resultan tanto por interacciones con el material soporte como por modificación covalente de residuos aminoácidos. Las propiedades que cambian significativamente luego de la inmovilización incluyen la actividad

22. H.E. Klei, D.W. Sundstrom y D. Shim in "Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach", J. Woodward, Ed., Oxford University Press, New York, 1985. pp. 49-54, y referencias therein.

específica, pH óptimo, K_m , selectividad y estabilidad.²³ Los métodos físicos de inmovilización, especialmente la encapsulación, dan lugar a cambios menos dramáticos en el comportamiento catalítico de las enzimas cuando se lo compara con métodos químicos de inmovilización o adsorción. Esto es porque la inclusión y encapsulación prácticamente no producen cambios en la estructura cuaternaria de la proteína, esta esencialmente permanece en su configuración nativa, en un ambiente hidrofílico y sin sufrir modificaciones covalentes.

Cuando una enzima es inmovilizada sobre un material soporte, una capa de difusión se origina alrededor de la partícula soporte, de tal manera que inclusive cuando el material es agitado vigorosamente, el sustrato debe ser transportado desde el seno de la solución, atravesando esta capa de difusión para alcanzar a la enzima inmovilizada. Los productos también deben difundir desde la superficie de la partícula hacia el seno de la solución; aparte de esto, pueden ocurrir fenómenos de repulsión estérica de sustratos y productos, considerando que la superficie del soporte con la enzima inmovilizada es un ambiente molecularmente abarrotado. Estos efectos estéricos son particularmente importantes para enzimas cuyos sustratos son de elevado peso molecular, ya que la accesibilidad al sitio activo generalmente se encuentra reducida luego de la inmovilización. El tamaño de partícula es también un factor de gran importancia; cuando las partículas son pequeñas, se ha observado que las propiedades catalíticas de las enzimas inmovilizadas se aproximan más a las de las enzimas en solución. La flexibilidad de los materiales poliméricos usados también tiene un importante rol en cuanto a las características y velocidad del transporte de sustratos y productos. Los soportes de carácter hidrofílico han demostrado tener menos efectos drásticos sobre las propiedades enzimáticas cuando son comparados con los materiales hidrofóbicos. Los grupos iónicos presentes en materiales poliméricos interactúan con las enzimas, y además afectan los pHs locales dentro del microambiente formado por la red polimérica.

Los métodos químicos de inmovilización pueden alterar la carga neta de las enzimas, así como su densidad de carga local en algunas regiones de la misma, debido a la modificación covalente de residuos cargados, como ser la lisina (NH_4^+), aspartato y glutamato (COO^-). Cambios conformacionales en la estructura secundaria y terciaria de la proteína pueden ocurrir como resultado de estas modificaciones covalentes, o debido a interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno o hidrofóbicas con el material soporte. Finalmente, pérdida de actividad puede ocurrir si aminoácidos esenciales para la catálisis son químicamente transformados.

Generalmente la actividad específica de las enzimas disminuye luego de la inmovilización. Esto es debido a que los sitios activos son menos accesibles para el sustrato, y a que tanto sustrato como productos deben difundir a través de la capa de solución que rodea a las partículas así como dentro de las redes poliméricas usadas para inmovilizar la enzima. Estos fenómenos dan como resultado una disminución de la V_{max} y eleva el valor del K_m aparente. La actividad de las enzimas inmovilizadas debería ser expresada como actividad

23. O.R. Zaborski, "Immobilized Enzymes", CRC Press, Cleveland, 1973. pp. 49-60.

específica (por ejemplo unidades por mg de proteína) y no como actividad por unidad de peso del soporte más proteína. Esto es porque la cantidad de proteína inmovilizada sobre un soporte varía desde unos pocos microgramos hasta cientos de miligramos por gramo de material soporte, dependiendo del método de inmovilización y del material soporte elegido. La mayor actividad específica para enzimas inmovilizadas han sido alcanzadas utilizando materiales hidrofílicos como soporte.

El pH óptimo para una determinada reacción enzimática puede modificarse hasta 3 unidades de pH luego de la inmovilización.²⁴ Esta alteración ocurre por dos fenómenos principales, uno es la carga propia del material soporte, y el segundo la modificación química de la enzima. La Figura 4.4 ilustra dramáticamente los cambios que pueden ocurrir en el pH óptimo de la quimotripsina, una enzima proteolítica, luego de haber sido inmovilizada covalentemente sobre poliornitina (un polímero con carga positiva) y utilizando un copolímero formado por anhídrido maleico y etilénico (con carga negativa).

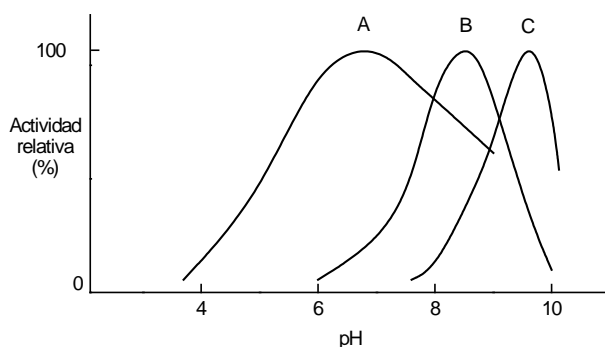


Figura 4.4. Actividad relativa vs pH para (B) quimotripsina nativa (pH óptimo 8.6) y para quimotripsina unida a (A) poliornitina (pH óptimo 7.0), (C) copolímero anhídrido etilénico/maleico (pH óptimo 9.4). Reprinted, by permission, from L. Goldstein and E. Katchalski, *Fresenius's Z. Anal. Chem.* **243**, 1968, 375-396. "Use of Water-Insoluble Enzyme Derivatives in Biochemical Analysis and Separation". © 1968 by Springer.

Este cambio en el pH óptimo puede ser explicado por una distribución no balanceada de H^+ y OH^- entre el seno de la solución y el material sobre el que la enzima se encuentra inmovilizada. En la Figura 4.5 se observa una cadena de poliornitina; sus cadenas laterales poseen grupos amino primarios que son utilizados para unir covalentemente moléculas enzimáticas. Algunos de esos grupos amino permanecen sin derivatizar luego del proceso de inmovilización, tanto sea por razones estéricas o porque las reacciones químicas de inmovilización no llegaron a completarse.

24. L. Goldstein y E. Katchalski, *Fresenius' Z. Anal. Chem.* **243**, 1968, 375-396.

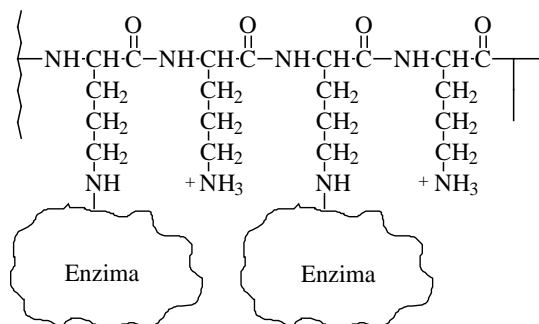


Figura 4.5. Enzima inmovilizada sobre poliornitina.

Los grupos amino primarios que permanecen en la molécula existen en su forma protonada, estos grupos -NH_3^+ cargados positivamente atraen grupos OH^- desde el seno de la solución. Esto incrementa la $[\text{OH}^-]$ local, respecto a la concentración de estos en el seno de la solución, entonces:

$$[\text{OH}^-]_{\text{superficie}} > [\text{OH}^-]_{\text{solución}},$$

$$\text{y } \text{pH}_{\text{superficie}} > \text{pH}_{\text{solución}}$$

Por esto, el pH óptimo *aparente* determinado se encuentra a valores menores de pH, este fenómeno se observa en la Figura 4.4 para quimotripsina: El pH óptimo aparente se observa a pH 7,0 cuando la enzima se encuentra inmovilizada sobre poliornitina, mientras que este valor es 8,6 para la misma enzima en solución.

Cuando la quimotripsina se inmoviliza utilizando el copolimero anhídrido maleico/etilénico, se crea un grupo ácido en la superficie de cada molécula enzimática inmovilizada, como se muestra en la Figura 4.6. Este material soporte y otros cargados negativamente atraen H^+ desde el seno de la solución hacia la superficie del material soporte, de tal manera que el pH local en la superficie es menor:

$$[\text{H}^+]_{\text{superficie}} > [\text{H}^+]_{\text{solución}}$$

$$\text{y } \text{pH}_{\text{superficie}} < \text{pH}_{\text{solución}}$$

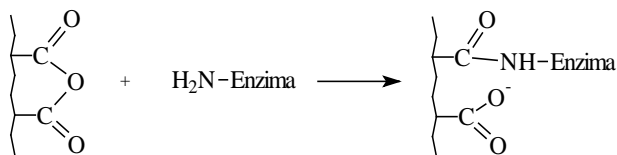


Figure 4.6. Enzima inmovilizada sobre anhídrido etilénico/maleico.

Debido a que el pH en la superficie del material soporte es menor que en el seno de la solución, el pH óptimo aparente se desplaza a valores más altos de pH, tanto cuando este u otros materiales soporte con carga negativa son utilizados para inmovilizar enzimas. La Figura 4.4 muestra que la quimotripsina inmovilizada sobre el copolímero anhídrido maleico/etilénico exhibe un pH óptimo de 9,4, aproximadamente una unidad de pH más alto que el observado para la enzima nativa sin inmovilizar.

El incremento del K_m aparente luego de la inmovilización puede ser elegantemente explicado considerando los efectos locales en la superficie del material soporte. Recordando la ecuación de Michaelis-Menten ($v = V_{\max} [S] / \{K_m + [S]\}$), y su derivación (Capítulo 2), se entiende que para enzimas en solución, K_m es independiente de la concentración enzimática, y constante bajo ciertas dadas condiciones experimentales. Las enzimas inmovilizadas suspendidas en un medio acuoso, poseen una capa de solvente que las rodea, no afectada por la agitación del medio, denominada capa de difusión de Nernst o simplemente capa de difusión. Sustratos y productos deben difundir a través de esta capa, y como resultado de ello, se establece un *gradiente de concentración* para ambos, sustratos y productos, como se puede observar en la Figura 4.7.

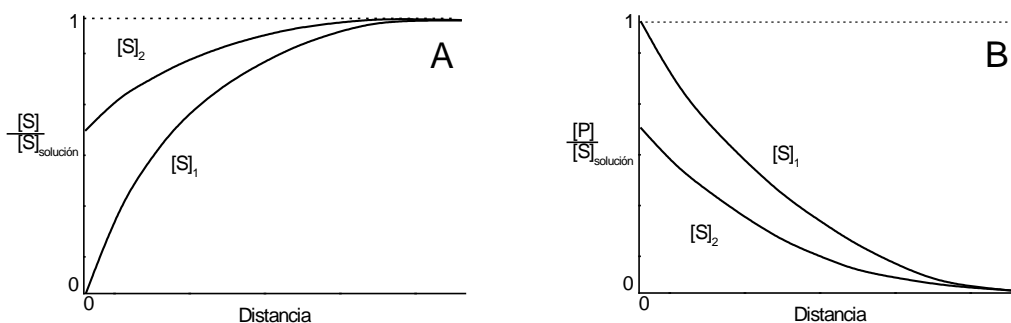


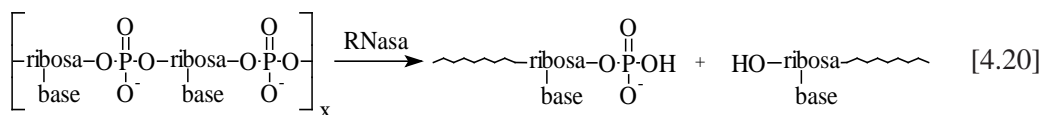
Figure 4.7. Concentración relativa de sustrato (A) y producto (B) en función de la distancia desde la superficie de una partícula de material soporte. $[S]_{2,\text{solución}} > [S]_{1,\text{solución}}$ y $[P]_{\text{solución}} = 0$.

El efecto de este gradiente de concentración es más evidente cuando la concentración de sustrato en la solución es menor, dado que el sustrato es convertido en producto al momento en que alcanza la superficie de la partícula, ocasionando que la concentración de sustrato en la superficie es cercana a cero. A concentraciones de sustrato muy altas, la velocidad de la reacción está limitada por la cinética enzimática y no por el transporte de masa, entonces las concentraciones superficiales no diferirán significativamente de las observadas en el seno de la solución. Es interesante notar que, debido al gradiente de concentración, la saturación con sustrato de las enzimas inmovilizadas ocurre a concentraciones mucho mayores que las requeridas para saturar la misma enzima en solución. Los valores de K_m aparente (K_m') para enzimas inmovilizadas son mayores que los obtenidos para enzimas nativas en solución.

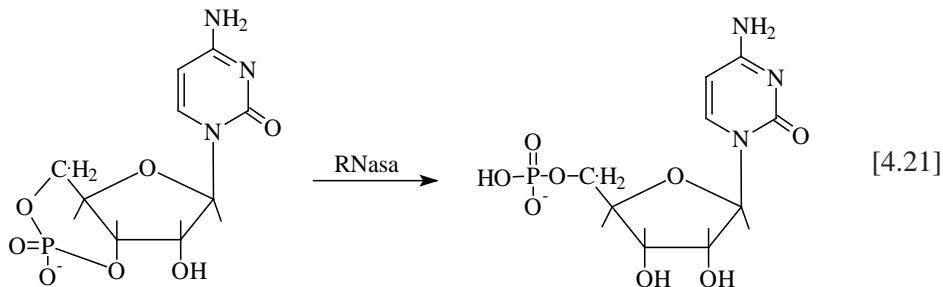
IV. ENZIMAS INMOVILIZADAS

El espesor de la capa de difusión puede ser disminuido utilizando partículas más pequeñas o mediante el aumento de la agitación de la solución; los valores de K_m' pueden entonces acercarse a los observados para la enzima en solución. Debe recordarse que factores estéricos y fuerzas electrostáticas pueden también afectar las concentraciones locales de sustratos, productos u otros compuestos, modificando el valor del K_m aparente.

Cuando enzimas que catalizan reacciones que involucran moléculas de alto peso molecular son inmovilizadas, se ha observado que su especificidad resulta alterada. Este fenómeno ocurre porque la difusión de sustratos macromoleculares es lenta, y porque factores estéricos disminuyen la actividad de la enzima entorpeciendo el acceso del sustrato al sitio activo enzimático. Por ejemplo, la enzima ribonucleasa (RNasa) cataliza la hidrólisis del RNA, molécula polimérica formada por nucleótidos unidos entre si por uniones fosfodiéster (Eq. 4.20):



La RNasa además cataliza la ruptura de enlaces fosfodiéster en sustratos de bajo peso molecular, tal como la citidina cíclica monofosfatada (cCMP) produciendo 5'-CMP (Eq. 4.21):



Cuando la RNasa se inmoviliza mediante uniones covalentes con los grupos hidroxilo de la agarosa, la actividad de esta enzima para degradar RNA disminuye, cuando es comparada con la enzima en solución.²⁵ Para realizar la comparación se asumió que la velocidad de degradación del cCMP no debería ser afectada significativamente por la inmovilización. Las velocidades normalizadas pueden ser calculadas como la velocidad de degradación de RNA dividido por la velocidad de degradación de cCMP. Estas velocidades fueron medidas utilizando como sustrato RNA de distintos pesos moleculares, y con los datos obtenidos fue posible correlacionar empíricamente el aumento del peso molecular del sustrato con la disminución de la velocidad catalítica:

25. R. Axen, J. Carlsson, J.-C. Janson y J. Porath, *Enzymologia* **41**, 1971, 359-364.

$$= A + B \times \log(\text{MW}) \frac{\text{Velocidad normalizada con enzima soluble}}{\text{Velocidad normalizada con enzima inmovilizada}} \quad [4.22]$$

Este estudio mostró claramente los efectos de la exclusión estérica observados sobre la velocidad de reacción cuando se utilizan enzimas inmovilizadas.

Cuando las enzimas son inmovilizadas, se observa generalmente un aumento de su estabilidad. Esta mayor estabilidad se observa tanto en cuanto la disminución de la pérdida de actividad a lo largo del tiempo, así como la mayor resistencia a la desnaturalización por efecto de la temperatura. Reactores utilizando enzimas inmovilizadas han sido utilizados durante varios meses con poco cambio en su eficiencia de conversión. La estabilidad respecto a la temperatura ha sido estudiada inmovilizando ureasa sobre una membrana de nylon. En la Figura 4.8 se compara la estabilidad de la ureasa inmovilizada y en solución, mediante la medición de la actividad relativa (respecto a la actividad inicial) en función del tiempo de incubación a temperaturas elevadas.²⁶ Se observa claramente que la estabilidad térmica es superior en la enzima inmovilizada, que resulta en parte del microambiente protectorio en la superficie del soporte.

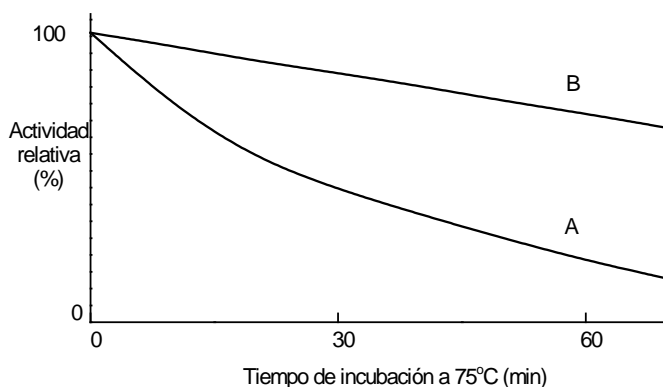


Figure 4.8. Estabilidad térmica de ureasa soluble (A) e inmovilizada en nylon (B) a pH 7.0. Reprinted, by permission, from P.V. Sundaram and W.E. Hornby, *FEBS Letters* **10**, October 1970, 325-327. "Preparation and Properties of Urease Chemically Attached to Nylon Tube".

© 1970 by Elsevier.

Un ejemplo espectacular del fenómeno de estabilización por inmovilización ha sido informado utilizando la enzima catecol-2,3-dioxigenasa.²⁷ Esta enzima fue purificada de la bacteria termofílica *Bacillus stearothermophilus*, y cataliza la conversión de catecol a

26. P.V. Sundaram y W.E. Hornby, *FEBS Lett.* **10**, 1970, 325-327.

27. R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, S. Ali y D. Cowan, *Enz. Microb. Technol.* **26**, 2000, 568-573.

2-hidroximuconico semialdehido (2-hydroxymuconic semialdehyde) (el que puede ser medido por absorbancia a 375 nm). La enzima en solución presenta máxima actividad a 50 °C, pero luego de la inmovilización en bolillas (beads) de glioxil (glyoxyl) agarosa con un paso de reducción con boro hidruro, la temperatura óptima se elevó a 70 °C. Cuando la concentración de proteína es de 0,010 mg/mL y a 55 °C, la vida media de la enzima soluble fue de 0,08 h, mientras que luego de la inmovilización este tiempo se eleva a 68 h. Esto representa una elevación de la estabilidad de 750 veces, que ha sido atribuido a la que la inmovilización previene la separación de las subunidades que forman esta enzima.

4.4 Reactores con enzimas inmovilizadas

Las enzimas pueden ser inmovilizadas sobre materiales soporte que permitan ser empacados en una columna, (dando lugar a un reactor de lecho empacado), como por ejemplo una columna típica de HPLC, lo que facilita el uso repetitivo de la enzima, permitiendo también la automatización de las mediciones.²⁸ Reactores tubulares abiertos también han sido construidos, mediante la inmovilización covalente de una enzima sobre la pared interna de tubos de polietileno o nylon.²⁹ Los reactores de enzimas inmovilizadas son usados en sistemas de infección en flujo (FIA), en los que una bomba se utiliza para forzar la solución tampón, o fase móvil, a través del reactor a una velocidad constante; una válvula inyectora permite la introducción de volúmenes precisos de solución, sea esta patrones de calibración conteniendo el sustrato de la enzima o bien muestras incógnitas; y por último un detector localizado cerca de la salida de la columna. Opcionalmente, la utilización de sistemas de muestreo automático (autosampler) y de adquisición-procesado de datos da lugar a un instrumento totalmente automático, para la medición enzimática del sustrato utilizado por la enzima inmovilizada. La fase móvil contiene todos los cosustratos y activadores requeridos para que ocurra la reacción enzimática, mientras que el sustrato esta ausente. Un sistema típico de reactor de lecho empacado puede usar un reactor de 25 cm de largo y 5 mm de diámetro interno, empacado con enzima inmovilizada sobre un material soporte sólido, de tal manera de soportar presiones altas. Velocidades de flujo de 0,5-2 mL/min y volúmenes inyectados de muestra de entre 10-100 µL son habitualmente utilizados. La detección involucra la utilización de los mismos métodos utilizados en ensayos enzimáticos homogéneos, y celdas de flujo para la detección óptica de absorbancia y fluorescencia, así como detectores electroquímicos amperométricos y potenciométricos pueden ser empleados, en los que celdas de flujo de bajo volumen, del orden de las decenas de microlitros son habitualmente utilizadas.

28. G.G. Guilbault, "*Handbook of Enzymatic Methods of Analysis*", Marcel Dekker, New York, 1976. pp. 510-517.

29. T. Ngo, *Int. J. Biochem.* **11**, 1980, 459-465.

Los reactores enzimáticos pueden ser operados en dos configuraciones básicas; el flujo de buffer (carrier) es continuo, o bien el flujo se detiene cuando la muestra alcanza el reactor (stopped-flow). A su vez los sistemas de flujo continuo se pueden clasificar en sistemas *abiertos* o *cerrados*. En los sistemas abiertos, como se muestra en la Figura 4.9, se utiliza una bomba para impulsar el buffer, el que luego de atravesar la válvula inyectora, reactor y detector, es colectado en un reservorio para su posterior descarte. Este tipo de sistema es el preferido para ensayar reactores enzimáticos, ya que el sustrato que no ha sufrido catálisis en la columna, así como cofactores y productos de la reacción enzimática no volverán a ponerse en contacto con la columna.

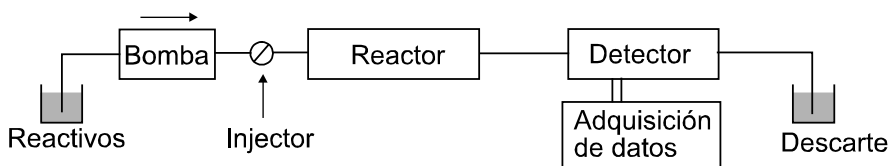


Figure 4.9. Diagrama de un sistema de reactor enzimático abierto.

Los sistemas cerrados pueden ser empleados cuando el reciclado del buffer es posible, cuando el buffer contiene altas concentraciones de todos los cosustratos necesarios, cuando el sustrato inyectado se consume totalmente dentro de la columna, y cuando los productos de la reacción enzimática no inhiben a la enzima inmovilizada. Un sistema cerrado en que se inmovilizaron enzimas del grupo de las oxidasas se observa en la Figura 4.10.

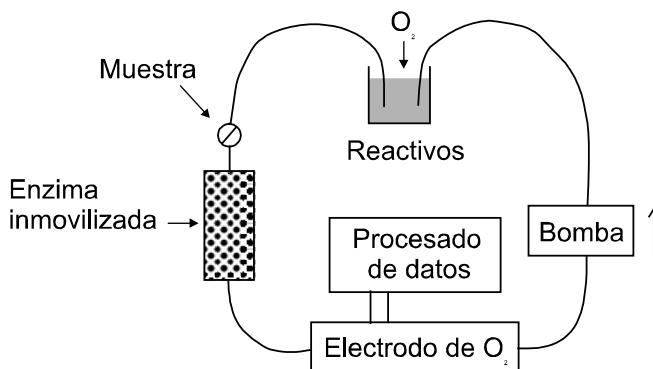


Figure 4.10. Diagrama de un sistema de reactor enzimático cerrado.

Tanto en el sistema de flujo continuo o el de flujo detenido descritos previamente, la cuantificación de la concentración de sustrato puede basarse en la medición de la señal producida a un tiempo fijo o bien cuando la reacción enzimática es completada. Si el flujo de buffer es constante, el volumen de muestra inyectado permanece un tiempo fijo en el reactor enzimático, y este tiempo está relacionado con el volumen de la columna (o más específicamente, con el volumen de la columna no ocupado por la fase estacionaria) y la velocidad de flujo de la fase móvil.

Reacciones indicadoras que son de naturaleza química pueden ser realizadas introduciendo el reactivo indicador directamente en la solución buffer o bien a la salida de la columna, por el método denominado de adición de reactivo postcolumna. La adición de reactivos en postcolumna diluye el eluyente de la columna, por lo que de ser posible, se trata de evitar agregando el indicador directamente en el buffer; sin embargo las condiciones bajo las cuales ocurren las reacciones químicas que llevan a la generación de color u otro efecto mensurable deben realizarse muchas veces mediante adición en postcolumna. En la Figura 4.11 se muestra un arreglo experimental para el análisis de urea utilizando un reactor con ureasa inmovilizada.³⁰ Cuando se adiciona hidróxido de sodio, el NH_4^+ producido en el reactor puede ser detectado utilizando un electrodo gaseoso potenciométrico sensible al amonio, colocado en una celda de flujo.

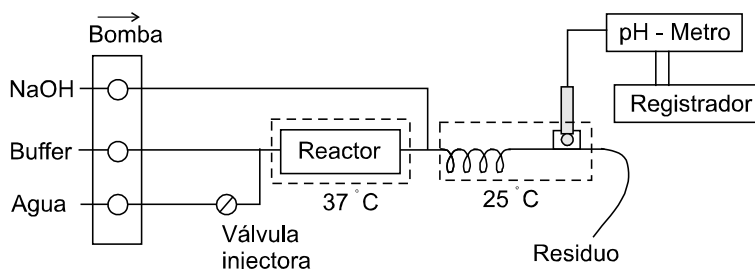


Figure 4.11. Sistema de reactor enzimático para la determinación de urea basado en ureasa inmovilizada y detección potenciométrica.³⁰

Si la reacción indicadora es también catalizada por una enzima, dos métodos podrían ser utilizados para la conversión del producto primario de la reacción en la especie detectable. El primero involucra el uso de una segunda columna conteniendo la enzima indicadora inmovilizada, colocado entre el reactor y el detector, configurando un sistema de dos reactores. El segundo procedimiento, más utilizado en la práctica, emplea un único reactor conteniendo coinmovilizadas ambas enzimas. Para lograr una conversión lineal del producto primario, debe recordarse que la cantidad de enzima indicadora presente debe ser suficiente para catalizar en forma completa la transformación del producto primario de la reacción; para ello, un exceso de la enzima indicadora debe estar presente.

Estos reactores son diseñados para la determinación de la concentración del sustrato, proceso en el cual es transformado en producto es su totalidad, y no es fácil adaptarlo para realizar mediciones de cinética. Los reactores enzimáticos que funcionan en la modalidad de flujo detenido (stopped flow) se pueden utilizar para realizar automáticamente mediciones de cinética enzimática. En la Figura 4.12³¹ se muestra un diagrama de un reactor de este tipo, que utiliza la adición de un reactivo químico postcolumna para obtener un derivado

30. G.G. Guilbault y J. Das, *Anal. Biochem.* **33**, 1970, 341-355.

31. M.D. Joseph, D. Kasprzak y S.R. Crouch, *Clin. Chem.* **23**, 1977, 1033-1036.

coloreado. En este sistema, el tiempo de residencia del analito en el reactor depende directamente de la velocidad de flujo de la fase móvil.

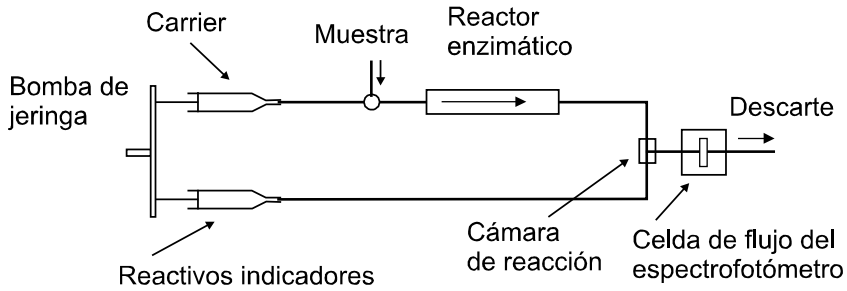


Figure 4.12. Reactor enzimático utilizado en la modalidad de flujo detenido (Stopped-flow), con detección de absorbancia.

4.5 Tratamiento teórico de los reactores enzimáticos de lecho empacado^{32,33}

En un reactor enzimático de lecho empacado, la enzima o enzimas son inmovilizadas en un soporte sólido adecuado, y luego este material es empacado en una columna. Estos reactores pueden ser caracterizados por la capacidad de la columna, C , y el grado de reacción P . C es definido en la Eq. 4.23:

$$C = kE_t\beta, \quad [4.23]$$

donde k es la constante de descomposición del complejo sustrato-enzima, (k_2 o k_{cat}), E_t es el número total de moles de enzima inmovilizada, y el valor de β es una constante para un determinado reactor, siendo igual a la relación entre el volumen muerto (void volume) y el volumen total del reactor (entonces, β es siempre menor a la unidad). El grado de reacción P varía entre cero (no hay formación de producto) y la unidad (todo el sustrato se convierte en producto).

Una ecuación equivalente a la de Michaelis-Menten ha sido derivada, para ser aplicada a sistemas de enzimas inmovilizadas en reactores de lecho empacado, la que se presenta en la Eq. 4.24:

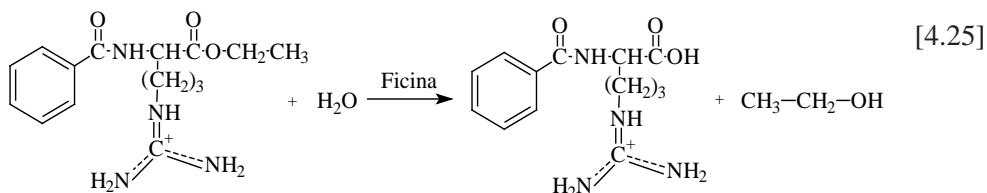
$$P[S]_0 = K_m \ln\{1-P\} + C/Q, \quad [4.24]$$

32. M.D. Lilly, W.E. Hornby y E.M. Crook, *Biochem. J.* **100**, 1966, 718-723.

33. G. Johansson, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **7**, 1982, 99-106.

donde Q es la velocidad de flujo de la fase móvil. En general, esta ecuación predice que para una dada capacidad de columna, el grado de reacción, P , es inversamente proporcional a la velocidad de la fase móvil, Q . Dicho de otra manera, cuanto más rápido el analito pase por el reactor, menor será la probabilidad de que ocurra conversión total de sustrato en producto.

La Eq. 4.24 ha sido probada experimentalmente utilizando carboximetilcelulosa como fase estacionaria, sobre la que previamente ficina (E.C.3.4.22.3) había sido inmovilizada. La enzima ficina cataliza la hidrólisis de una variedad de esteres, el sustrato N-benzoil-L-arginina etil ester (BAEE) fue elegido por los autores para realizar esta serie de experimento (Eq. 4.25):



Utilizado una concentración inicial de sustrato constante $[S]_0$, el efecto de la velocidad de flujo sobre el grado de conversión ha sido determinado. La Figura 4.13 muestra la dependencia de P respecto a la relación Q/C , como es asumido por la Eq. 4.24, así como la relación experimental que existe entre P y Q obtenida realizando experimentos en el reactor con ficina inmovilizada. Los datos experimentales obtenidos muestran buena correlación con las predicciones elaboradas utilizando el modelo teórico, es evidente que la completa conversión del sustrato en producto requiere velocidades de flujo bajas y elevada capacidad de columna. Las curvas teóricas utilizan concentraciones de sustrato constantes $[S]_0$ que son múltiplo de K_m' , con el objeto estudiar los cambios de K_m' con respecto a la velocidad de flujo.

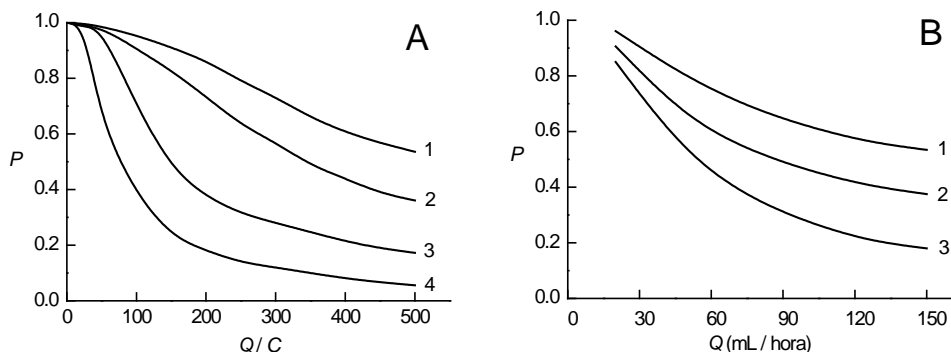


Figure 4.13. Dependencia teórica (A) y experimental (B) del grado de reacción respecto a la velocidad de flujo. (A) $K_m' = 2,5 \text{ mM}$: curva 1, $[S]_0 = 0,1 K_m'$; curva 2, $[S]_0 = K_m'$; curva 3, $[S]_0 = 4 K_m'$; curva 4, $[S]_0 = 10 K_m'$. (B) $[S]_0 = 0,5 \text{ mM}$, $5,0 \text{ mM}$ y 15 mM para curvas 1, 2 y 3, respectivamente.³² Reprinted, by permission, from M.D. Lilly, W.E. Hornby and E.M. Crook, *Biochem. J.* **100**, 1966, 718-723. "The Kinetics of Carboxymethylcellulose-Ficina in Packed Beds".

© 1966 by The Biochemical Society, London.

Previamente en este capítulo, se noto que el K_m aparente de las enzimas inmovilizadas esta determinado, entre otros parámetros, por el grosor de la capa de difusión que rodea a las partículas. En los reactores enzimáticos de lecho empacado, el grosor de esta capa varia con la velocidad de flujo de la fase móvil. Si la velocidad de flujo es elevada, la capa de difusión se reduce, y consecuentemente los valores de K_m' serán más cercanos al valor real K_m para esta enzima en solución. Este efecto también ha sido observado utilizando un reactor empacado con ficina inmovilizada sobre CM-celulosa; datos experimentales que muestran la relación entre K_m' y la velocidad de flujo Q obtenidos a distintas fuerzas iónicas se presentan en la Figura 4.14.

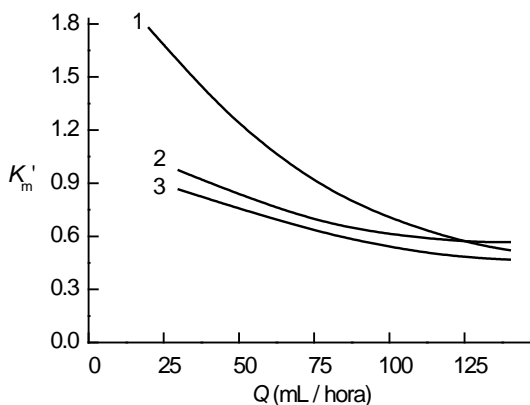


Figure 4.14. Efecto de la velocidad de flujo sobre el K_m' de ficina inmovilizada para el sustrato BAEE, a distintas fuerzas iónicas, 0,04 M (curva 1), 0,1 M (curva 2) y 0,4 M (curva 3).³² Reprinted, by permission, from M.D. Lilly, W.E. Hornby and E.M. Crook, *Biochem. J.* **100**, 1966, 718-723. "The Kinetics of Carboxymethylcellulose-Ficin in Packed Beds".

© 1966 by The Biochemical Society, London.

Estos resultados muestran que una velocidad de flujo lenta es necesaria para obtener la transformación cuantitativa de sustrato en producto, cuando se consideran reactores de lecho empacado. La variación del K_m' con la velocidad de flujo indica que velocidades menores producen mayores valores de K_m' ; como consecuencia la parte lineal de la curva de saturación se extiende hasta concentraciones más elevadas de sustrato cuando la velocidad de flujo es baja. Este efecto se vuelve evidente cuando no ocurre una conversión completa del sustrato durante su tiempo de residencia en el reactor.

En un estudio más reciente, la enzima glucosa oxidasa fue inmovilizada por inclusión en un hidrogel basado en hidroxietil metacrilato, se ha probado que la Ecuación 4.24 también puede aplicarse para esta enzima inmovilizada, que emplea dos sustratos.³⁴ Gráficos

34. A. Giuseppe-Elie, N.F. Sheppard, S. Brahim y D. Narinesingh, *Biotechnol. Bioeng.* **75**, 2001, 475-484.

lineales de $P[S]_0$ respecto a $\ln(1-P)$ fueron obtenidos, y los valores de K_m' fueron calculados utilizando las pendientes de esas curvas. Sin embargo, la concentración del cosustrato (oxígeno disuelto) no fue medida o controlada, y por ello, los valores medidos de K_m' se incrementaron desde 2,95 mM a $Q = 0,33$ mL/min hasta 11,3 mM a $Q = 1,40$ mL/min. Esto ilustra la importancia de utilizar un modelo cinético apropiado para estudiar y entender el comportamiento de los reactores enzimáticos de lecho empacado.

4.6 Lecturas sugeridas

- O. Zaborsky, “*Immobilized Enzymes*”, CRC Press, Cleveland, 1973.
- L.B. Wingard, Jr., E. Katchalski-Katzir y L. Goldstein, Eds., “*Applied Biochemistry and Bioengineering, Volume 1: Immobilized Enzyme Principles*”, Academic Press, New York, 1976.
- L.B. Wingard, Jr., E. Katchalski-Katzir y L. Goldstein, Eds., “*Applied Biochemistry and Bioengineering, Volume 3: Analytical Applications of Immobilized Enzymes and Cells*”, Academic Press, New York, 1981.
- P.W. Carr y L.D. Bowers, “*Chemical Analysis, Volume 56: Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry*”, John Wiley and Sons, New York, 1980.
- G.G. Guilbault, “*Analytical Uses of Immobilized Enzymes*”, Pergamon Press, New York, 1984.
- R.L. Lundblad, “*Chemical Reagents for Protein Modification, 2nd Ed.*”, CRC Press, Boca Raton, 1991.
- Y. Lvov y H. Moehwald, Eds., “*Protein Architecture: Interfacing Molecular Assemblies and Immobilization Biotechnology*”, Marcel Dekker, New York, 2000.

4.7 Problemas

1. Describa los pasos necesarios para la preparación de un reactor enzimático de lecho empacado (packed-bed) para medir colesterol utilizando la enzima colesterol oxidasa y una fase estacionaria formada por partículas de poliestireno. En la ausencia de cualquier reacción indicadora, que tipo de detector podría ser utilizado para medir directamente el peróxido de hidrógeno que se producirá en el reactor? Sugiera como podría modificarse el sistema de tal manera que un detector de absorbancia puede ser utilizada para medir en forma continua a la salida de la columna.

2. Sugiera mecanismos posibles que expliquen porqué la inmovilización covalente de la ureasa en partículas de copolímero etileno/anhídrido maleico podría ocasionar cambios en (a) su pH óptimo aparente, y (b) su K_m aparente para urea.

3. La figura más abajo (Figura 4.15) muestra un nuevo tipo de reactor enzimático que ha sido diseñado para la medición de colina y acetilcolina, utilizando las enzimas acetilcolinesterasa y colina oxidasa. Las reacciones que son catalizadas por estas enzimas se muestran a continuación:

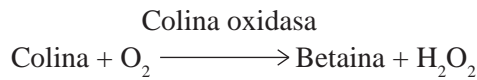
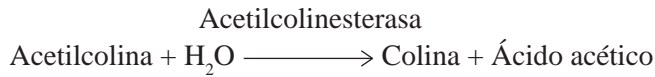


Figura 4.15 A

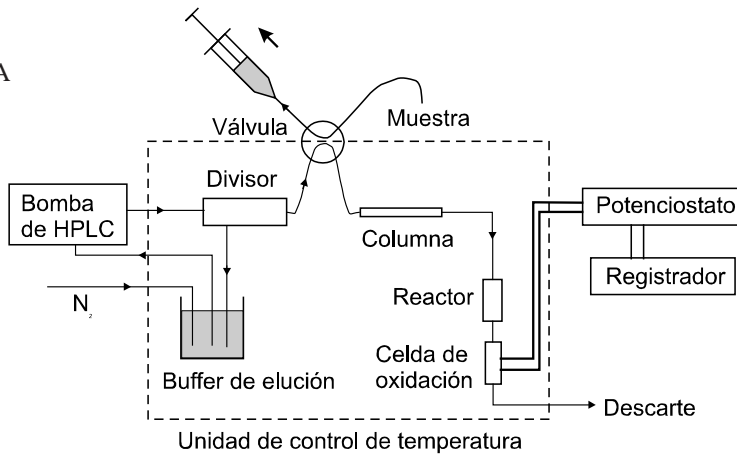
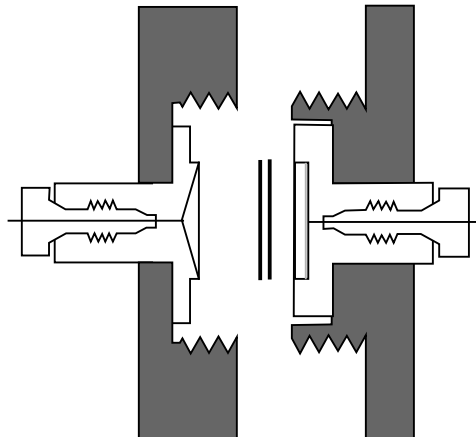


Figura 4.15 B



IV. ENZIMAS INMOVILIZADAS

En este reactor, la enzima es retenida entre dos membranas de filtración con un poro de $0,04 \mu\text{m}$, membranas que han sido colocadas dentro de una celda de flujo. Una bomba peristáltica y un inyector se han colocado “aguas arriba” del reactor. Cuando se inyectan soluciones conteniendo acetilcolina y/o colina, estas reaccionan con la enzima o enzimas correspondientes produciendo peróxido de hidrógeno. El H_2O_2 es detectado “aguas abajo” del reactor, con un electrodo de trabajo de platino polarizado a un potencial de $+700 \text{ mV}$ versus SCE, de tal manera que el H_2O_2 es convertido en O_2 .

- (a) ¿Este método de inmovilización es un método físico o químico? ¿Debería este tipo de inmovilización afectar el K_m aparente o el pH óptimo de las enzimas? Justifique su respuesta afirmativa o negativa.
- (b) Dibuje la forma de la respuesta de corriente versus [acetilcolina] para concentraciones muy bajas de acetilcolina, esto es, valores superiores al K_m de la acetilcolinesterasa.
- (c) Este reactor puede ser utilizado para estudiar el efecto de distintos inhibidores reversibles sobre la acetilcolinesterasa, inyectando muestras conteniendo la misma cantidad de la molécula sospechada de actuar como inhibidor junto con acetilcolina, esta última en concentraciones crecientes. Dibuje las curvas de Lineweaver-Burk ($1/\text{corriente}$ vs $1/[\text{acetilcolina}]$) que deberían ser obtenidas en ausencia y en presencia de un inhibidor reversible competitivo de la acetilcolinesterasa.

4. A pH 6, la enzima fumarasa ($50 \text{ kD}/\text{subunidad}$) transforma el fumarato a malato, y tiene, en solución, un K_m para fumarato de $5,7 \mu\text{M}$. La constante de disociación para el complejo enzima-sustrato dando lugar a la enzima más malato ha sido medido, el valor obtenido ha sido $1,45 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$.

- (a) Proponga dos métodos para inmovilizar fumarasa covalentemente sobre cuentas de vidrio de poro controlado.
- (b) Se encontró que las cuentas de vidrio de (a) tienen $0,10$ gramos de enzima por gramo de masa total. Una columna de 25 cm de largo y 5 mm de diámetro interno fue empacada con $3,0 \text{ g}$ de este material. El volumen total de la columna es 5 mL , y se determinó que su volumen muerto (void volume) es de $2,0 \text{ mL}$. Calcule la capacidad de este reactor enzimático de lecho empacado, en mol/min .
- (c) Calcule la máxima velocidad de flujo que puede ser empleada con este reactor, para lograr como mínimo la conversión del 95% del fumarato en malato, cuando $[\text{S}]_o = 0,01K_m'$, $[\text{S}]_o = 0,10K_m'$, y $[\text{S}]_o = K_m'$.

CAPÍTULO 5

ANTICUERPOS

5.1 Introducción

Los métodos enzimáticos descritos en los tres capítulos anteriores son herramientas bioanalíticas importantes para la cuantificación de compuestos que participan en reacciones bioquímicas catalizadas enzimáticamente. Para un número extenso de compuestos bioquímicos de interés analítico, sin embargo, las técnicas enzimáticas de análisis no son adecuadas. Estas especies no están implicadas en los procesos metabólicos para los cuales una enzima suficientemente selectiva existe, y pueden incluso no ser las especies que se encuentran comúnmente en los seres vivos. Para muchos de estos analitos, sean estos macromoleculares o de peso molecular relativamente bajo, los *inmunoensayos* son los métodos de elección.

Los inmunoensayos se basan en las características de las uniones selectivas de los *anticuerpos*, grandes glicoproteínas con un peso molecular de 150 kD, que poseen dos sitios de unión idénticos por molécula, por eso se dice que son bivalentes. Son el sistema de defensa de los vertebrados (los invertebrados también producen anticuerpos, pero no son comparables), se producen por inmunorepuesta, al enfrentarse el organismo a agente *inmunogenico*, que puede ser definido como cualquier agente capaz de provocar una inmunorepuesta. Los compuestos inmunogenéticos tienen altos pesos moleculares (> 1 kD), tienen complejidad química (por ejemplo el polietilenglicol no es inmunogenético) y son extraños para el organismo individual.¹ Cuando un organismo entra en contacto con un antígeno se dispara una cadena de acontecimientos que conducen a la activación de los linfocitos (células blancas de la sangre) y a la síntesis de los anticuerpos que se unen selectivamente el antígeno. Una representación esquemática de la inmunorepuesta puede observarse en la Figura 5.1.

Una vez que se hayan generado los anticuerpos, las características propias que le permiten unirse selectivamente con compuestos inmunogenicos de alto peso molecular, también permiten su interacción con otras especies que posean ciertas semejanzas estructurales. Los *antígenos* son las especies que son capaces de unirse selectivamente a los componentes de

1. C.R. Young: “*Structural Requirements for Immunogenicity and Antigenicity*”, en “*Molecular Immunology*”, M.Z. Atassi, C.J. Van Oss and D.R. Absolom, Eds., Marcel Dekker, New York, 1984.

la inmunorespuesta, tales como anticuerpos (inmunidad humoral) y linfocitos (inmunidad celular). Los antígenos no son necesariamente capaces de generar la inmunorespuesta por ellos mismos; así, todos los antígenos no son inmunogenicos, mientras que todos los agentes inmunogenicos son también antígenos. Los *haptenos* son compuestos de bajo peso molecular que pueden producir una inmunorespuesta solamente cuando están químicamente unidos a un compuesto de alto peso molecular, tal como una proteína portadora (carrier protein).

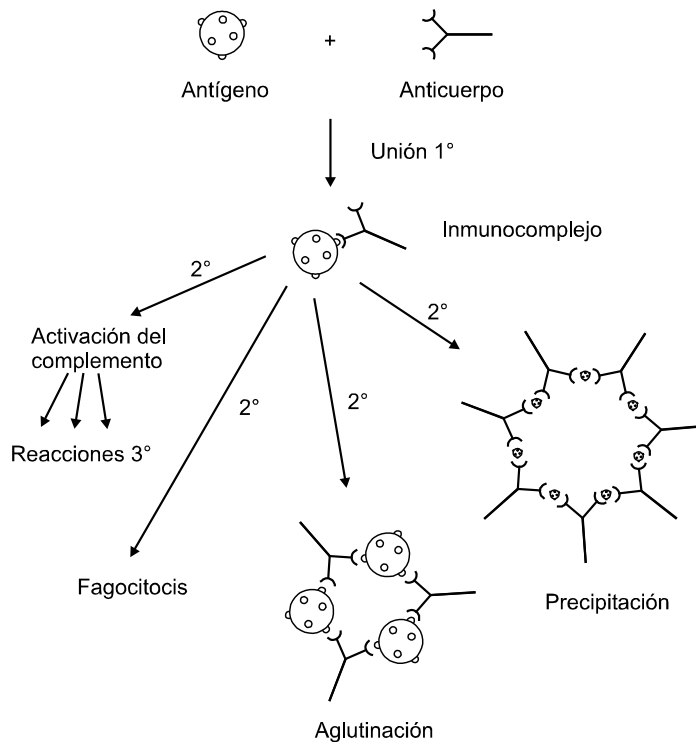


Figura 5.1. Representación simplificada de la inmunorespuesta.

Los métodos basados en los inmunoensayos se benefician del reconocimiento y unión selectiva de los anticuerpos para el reconocimiento y cuantificación de antígenos o haptenos.

5.2 Propiedades Estructurales y Funcionales de los Anticuerpos

Cuando los glóbulos rojos son retirados de la sangre entera, y el plasma resultante se deja coagular, el fibrinógeno puede removerse, obteniéndose el *suero* sanguíneo. El suero contiene una variedad de proteínas, algunas de las cuales se llaman *globulinas* porque sus características de solubilidad son diferentes de las otras proteínas del suero. Los anticuerpos

son una subclase de las globulinas del suero que pueden unirse selectivamente a otras moléculas. Los anticuerpos también son llamados *inmunoglobulinas* (Ig).

Todas las inmunoglobulinas comparten un número de características estructurales.² Ellas poseen dos cadenas polipeptídicas “livianas”, cada una con un peso molecular aproximado de 25 kD, y dos cadenas polipeptídicas “pesadas”, de aproximadamente 50 kD cada una. Estas cuatro cadenas están unidas formando una única molécula de anticuerpo, mediante enlaces disulfuro, formando una estructura con forma de “Y” con un eje central de simetría (Figura 5.2). Las dos mitades de una inmunoglobulina natural son idénticas.

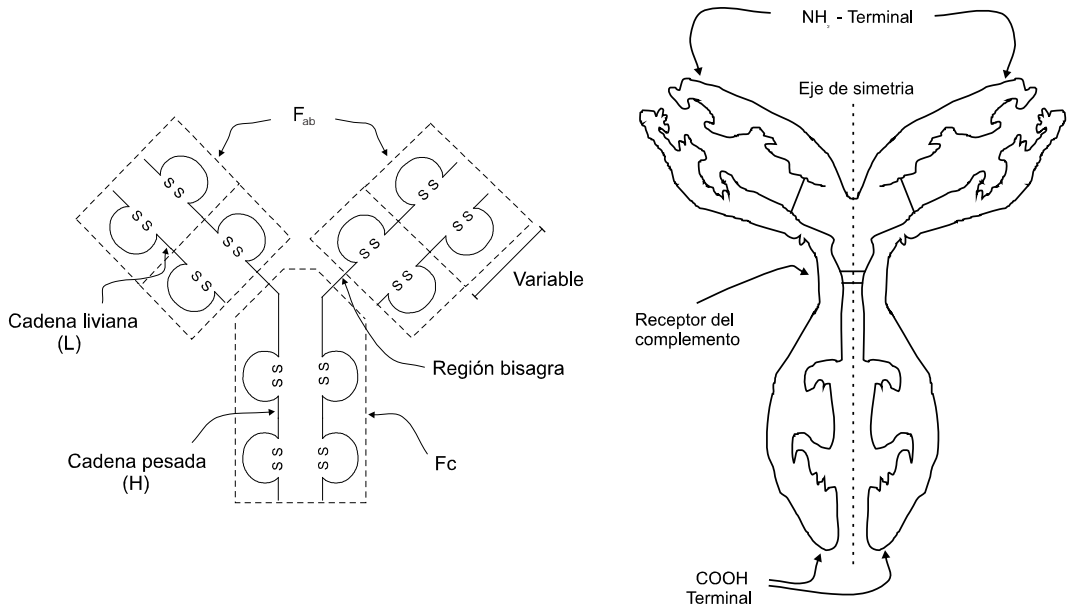


Figura 5.2. Diagramas estructurales que representan las moléculas del anticuerpo

Los extremos N-terminal de las cadenas polipeptídicas livianas (L) se encuentran cerca de la parte superior de la estructura en forma de “Y”, en los fragmentos denominados F_{ab} . Éstos son los fragmentos del anticuerpo que se unen al antígeno, fragmentos que han sido clivados y utilizados en inmunoensayos basados en interacciones primarias antígeno-anticuerpo, de similar manera a cuando una molécula de anticuerpo completo se utiliza. Es la secuencia de aminoácidos de estos extremos N-terminales los que determinan las características específicas del anticuerpo, en cuanto a su especificidad para unirse a otra molécula. La secuencia de las cadenas pesadas (H) en los fragmentos llamados F_c (fragmentos cristalizables) determina la clase del anticuerpo: las clases más abundantes se llaman IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. Anticuerpos de diversas clases pueden tener exactamente las mismas características de afinidad

2. E. Benjamini, G. Sunshine y S. Leskowitz, “*Immunology: A Short Course*”, Wiley-Liss, New York, 1996. pp. 57-75.

por el mismo antígeno, pero exhiben diferentes características funcionales. Las abundancias relativas y las características funcionales de las cinco clases principales de anticuerpos³ se enumeran en la Tabla 5.1.

Clase de inmunoglobulina	Concentración en suero (adulto)	Propiedades funcionales
IgG	12 mg/mL	Solo Ig puede atravesar la placenta
IgE	0,3 µg/mL	Grupo mayor involucrado en la respuesta alérgica
IgM	1,0 mg/mL	Puede causar lisis bacteriana por activación de componentes del suero
IgA	1,8 mg/mL	Encontrada en secreciones (lagrimas, saliva)
IgD	30 µg/mL	Encontrada en linfocitos

Tabla 5.1. Propiedades de algunas inmunoglobulinas³

El antisuero es esa parte del suero que contiene los anticuerpos. Puede prepararse a partir del suero entero, a través de una serie de pasos de purificación, por ejemplo por precipitación con sulfato de amonio, donde en pasos sucesivos se agrega sulfato de amonio hasta lograr determinada concentración, esta genera un precipitado, el que se separa por centrifugación. El precipitado es resuspendido en buffer, mientras que el sobrenadante es sometido a otro ciclo de agregado de sulfato de amonio, precipitación, centrifugación y resuspensión en buffer.⁴ El antisuero luego es dializado y/o purificado por cromatografía de afinidad, y ensayado para proteína total.

La selectividad de las interacciones antígeno-anticuerpo (y haptenos-anticuerpo) es análoga a la selectividad de las interacciones entre las enzimas y sus sustratos. El sitio del antígeno que se une a un anticuerpo tiene una estructura que permite un ajuste complementario con los elementos estructurales y los grupos funcionales del anticuerpo. La porción del antígeno que interactúa específicamente con el sitio de unión al anticuerpo se llama determinante antigénico, o *epitope*. El epitope tiene un tamaño de aproximadamente $0,7 \times 1,2 \times 3,5$ nm, lo que es equivalente a aproximadamente 5-7 residuos aminoacídicos. El sitio complementario en el anticuerpo se llama el *paratope*, de un tamaño casi igual.

Los antígenos se pueden clasificar según sus características de valencia (esto es, el número total de sitios de unión) y su determinante (el número diferentes tipos de sitios)⁵. Hay cuatro clases de antígenos:

3. D.R. Davies y H. Metzger, *Ann. Rev. Immunol.* **1**, 1983, 87-117.

4. L. Hudson y F.C. Hay, "*Practical Immunology*", 3rd Ed., Blackwell Scientific Publications, London, 1989. p. 2.

1. Solamente un epítotope en la superficie que es capaz de unirse a un anticuerpo: *unideterminado* y *univalente*. Los haptenos son unideterminados y univalentes.
2. Dos o más epítotope de la misma clase en una molécula de antígeno: *unideterminado* y *polivalente*.
3. Muchos epítotope de diversas clases, pero solamente uno de cada tipo en una molécula de antígeno: *multideterminado* y *univalente*. La mayoría de los antígenos proteicos son de esta categoría.
4. Muchos epítotope de diversas clases, y más de uno de cada tipo por molécula de antígeno: *multideterminado* y *polivalente*. Las proteínas que contienen múltiple subunidades idénticas y las células enteras pertenecen a esta categoría.

La unión entre el antígeno y el anticuerpo implica interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, por fuerzas de van der Waals, así como también puentes de hidrógeno. Éstas son todas fuerzas relativamente débiles, no covalentes, y por esta razón, la complementariedad debe extenderse sobre un área relativamente grande, de tal manera de permitir la adición de todas las interacciones disponibles. Las constantes de asociación del antígeno-anticuerpo son a menudo tan altas como 10^{10} M^{-1} .

5.3 Anticuerpos policlonales y monoclonales

Los anticuerpos policlonales son aislados directamente del suero, con un procedimiento similar al que fue enunciado anteriormente en este Capítulo. El agente inmunogénico utilizado para generar anticuerpos policlonales puede consistir en una molécula pequeña (un hapteno) unida covalentemente a una proteína portadora. El antisuero que resulta contendrá una mezcla de los anticuerpos que pueden unirse a diversos epítotope resultantes de la conjugación del hapteno-portador, así como los anticuerpos generados en respuesta a otros agentes inmunogénicos presentes en el organismo. Esto da lugar a un antisuero que posee una amplia gama de selectividad y afinidad, y pueden dar lugar a *reactividad cruzada* (cross-reactivities) importante, o a interferencias, cuando este antisuero se emplea en inmunoensayos.

Los anticuerpos⁶ monoclonales son una población homogénea de moléculas idénticas de anticuerpo, teniendo paratopes y afinidad idénticos para un solo epítotope antigénico. Estos anticuerpos se sintetizan en un procedimiento descrito por primera vez por Milstein y Köhler en los años 70, trabajo por el que estos investigadores ganaron el premio Nobel. La Figura 5.3 demuestra resumidamente el procedimiento empleado por Milstein y Köhler para la producción monoclonal de anticuerpos.

5. E. Benjamini, G. Sunshine y S. Leskowitz, "Immunology: A Short Course", Wiley-Liss, New York, 1996. pp. 48-50.

6. E. Benjamini, G. Sunshine y S. Leskowitz, "Immunology: A Short Course", Wiley-Liss, New York, 1996. pp. 133-135.

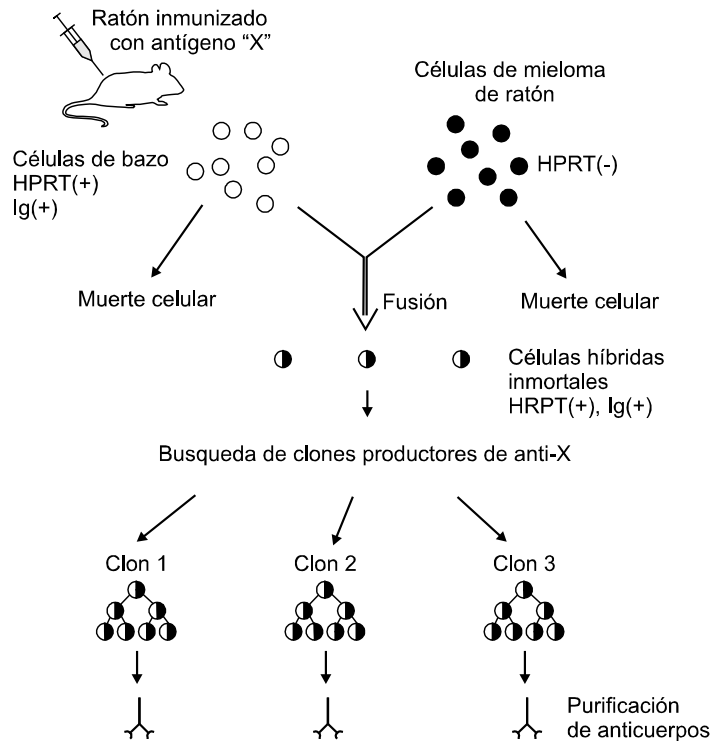


Figura 5.3. Procedimiento para la generación de hibridomas para la producción de anticuerpos monoclonales.

Un animal inmunizado con un antígeno (Ag) aumenta su población de linfocitos productores de anticuerpos (Ab). Estas células son de efímera duración, y pueden mantenerse en cultivos celulares solamente por algunos días. Células malignas (cancerígenas) se cultivan por separado. Estas células son esencialmente inmortales, y pueden ser cultivadas por años, pero son pobres productores de Abs. Algunas células malignas son deficientes en la enzima hipoxantina fosforibosiltransferasa (HPRT), perteneciente a un camino metabólico que permite sintetizar nucleótidos y morirán a menos que se provea de estos al medio de cultivo. Estas células malignas se utilizan para la producción de hibridomas.

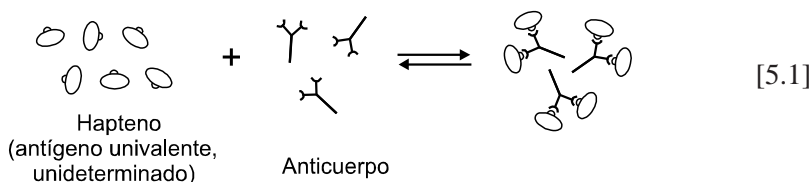
Los hibridomas (línea celular obtenida por fusión) son producidos fundiendo los linfocitos aislados del bazo de un animal inmunizado con las células malignas HPRT-deficientes. Las células que no se han fusionado mueren, puesto que las células del bazo sobreviven solamente algunos días, mientras que las células malignas carecen de HPRT. Las células fusionadas, sin embargo, son positivas para HPRT así como inmortales; estos hibridomas o células híbridas conservan las características para la producción de Ab de las células del bazo. Líneas celulares que producen un anticuerpo específico son originadas mediante la clonación y cultivo de una única célula inmortal. De esta manera, cada clon produce anticuerpos específicos para *un único epítipo*.

Mientras que los costos de producción de los anticuerpos monoclonales son inicialmente muy elevados, ofrecen muchas ventajas respecto a los antiseros policlonales, cuando los anticuerpos son utilizados como reactivo analítico. De gran importancia es la inmortalidad de la línea celular del hibridoma: los Abs monoclonales producidos por una particular línea celular presentarán relativamente poca variación entre distintas partidas, y la utilización repetida de animales de laboratorio para la producción del anticuerpo llega a ser innecesaria. Además, la selectividad hacia un único epítopo del Ab monoclonal tiende a reducir al mínimo las reacciones cruzadas, excepto con los epítopes que poseen características estructurales muy similares al epítopo del antígeno original.

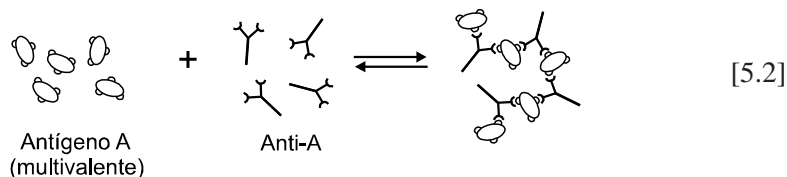
5.4 Interacciones antígeno-anticuerpo

Las interacciones de los anticuerpos con sus moléculas de unión selectivas, antígenos o haptenos, se clasifican como interacciones de unión *primarias* o *secundarias*. Las interacciones primarias implican el reconocimiento y la combinación específicos de un determinante antigénico (epítopo) con el sitio de unión (paratopo) de su anticuerpo correspondiente. Todas las interacciones Ab-Ag comienzan con una interacción primaria, que ocurre muy rápidamente (milisegundos), y son macroscópicamente invisibles.

Las relaciones de equilibrio implicadas en la interacción de unión primaria se pueden estudiar usando los haptenos, ya que debido a su naturaleza univalente y unideterminada se evita que ocurran interacciones secundarias. Los haptenos en estado libre se encuentran en equilibrio con aquellos unidos a anticuerpos, según puede verse a continuación (Eq. 5.1):



Las reacciones secundarias del anticuerpo-antígeno ocurren como resultado de la multivalencia del antígeno, y dan lugar a la aglutinación o a la precipitación de una red polimérica de antígeno-anticuerpo. Un producto visible se forma en un tiempo que va desde algunos minutos o unas pocas horas (Eq. 5.2):



Las interacciones primarias y secundarias Ag-Ab se pueden utilizar con fines analíticos, pero los métodos bioanalíticos cuantitativos hacen uso principalmente de las interacciones de unión primarias. La constante intrínseca de la asociación que caracteriza la unión del anticuerpo-epitope (hapteno) se llama afinidad:



$$\text{Afinidad} = K = [\text{Ab:H}]/[\text{Ab}][\text{H}] \quad [5.4]$$

Los valores típicos de afinidad⁷ para las interacciones anticuerpo-hapteno están en el rango de 10^5 a 10^{12} M^{-1} . Debido a las muy altas afinidades implicadas, la reacción reversa que involucra el rompimiento de la unión Ab-H se puede lograr solamente bajo condiciones extremas: en condiciones de pH altos o bajos, alta fuerza iónica, o en la presencia de iones caotrópicos (por ejemplo perclorato) o de desnaturalizantes (urea, guanidinium), que interfieren con las uniones por puente de hidrógeno.

Los valores de afinidad son determinados experimentalmente manteniendo una concentración constante de Ab total, y variando la concentración de H. La cuantificación de $[\text{H}]_{\text{libre}}$ y $[\text{H}]_{\text{unido}}$ permite entonces la construcción de un diagrama de Scatchard, donde $[\text{H}]_{\text{unido}}/\{[\text{H}]_{\text{libre}}[\text{Ab}]_{\text{total}}\}$ es graficado versus $[\text{H}]_{\text{unido}}/[\text{Ab}]_{\text{total}}$. La pendiente negativa del diagrama obtenido es la inversa de la afinidad, $-K$. Los diagramas de Scatchard para anticuerpos monoclonales y policlonales se muestran en la Figura 5.4. Observe que los anticuerpos policlonales producen un diagrama de Scatchard curvado, debido al rango de selectividades que poseen diferentes epitopes.⁸

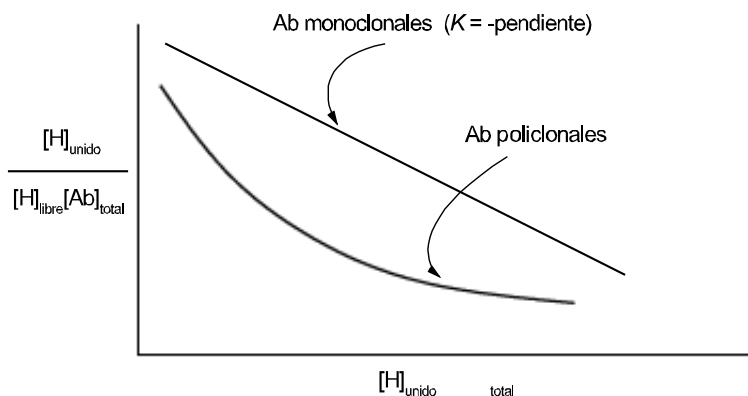


Figura 5.4. Diagramas de Scatchard para anticuerpos monoclonales y policlonales.

7. D. Hawcroft, T. Hector y F. Rowell, "Quantitative Bioassay", Wiley, New York, 1987. p. 91.

8. E.T. Maggio, "Enzyme-Immunoassay", CRC Press, Boca Raton, 1980. pp. 12-14.

Para los anticuerpos policlonales, los valores experimentales de K representan una afinidad media, que se representa generalmente como K_0 .

5.5 Aplicaciones analíticas de las interacciones secundarias antígeno-anticuerpo

5.5.1 Reacciones de aglutinación

La aglutinación ocurre cuando un anticuerpo interactúa recíprocamente con un antígeno polivalente de gran tamaño (una partícula insoluble, por ejemplo un glóbulo rojo), dando por resultado la reticulación de las partículas del antígeno por el anticuerpo. Esto conduce eventualmente al agrupamiento, o a la aglutinación, procesos que no ocurrirán si se utilizan haptenos. La aglutinación puede ocurrir cuando un antígeno unideterminado y polivalente (digamos, poseyendo muchas copias de un solo epitope "A") interactúa con un solo anticuerpo (Anti-A); también puede ocurrir si un antígeno multideterminado univalente (con los epitopes A, B, C, etc.) interactúa con por lo menos dos anticuerpos distintos (Anti-A más Anti-B, por ejemplo). Si la aglutinación ocurre o no depende de las concentraciones relativas de antígenos y de anticuerpos.

La *prueba de aglutinación* se utiliza como un ensayo cualitativo para la presencia de anticuerpos en suero, y también se utiliza para caracterizar los grupos sanguíneos. Como ejemplo, consideraremos una prueba para la presencia de anticuerpos contra la bacteria patógena *Brucella abortus*.⁹ En este ensayo, una serie de tubos de prueba son preparados, donde cada uno contiene la misma cantidad de una suspensión bacteriana, que es el antígeno. A cada tubo se le agregan soluciones cada vez más diluidas del suero que se está analizando. Si el anticuerpo está presente, la aglutinación será observada sobre un rango de las diluciones del suero, según lo demostrado en la Figura 5.5. Dos zonas de dilución son evidentes, una es llamada la "prozona" y la otra la "zona de aglutinación". En la prozona, no hay diferencia evidente entre antes y después de agregar el suero e incubar por varios minutos. En la zona de aglutinación, se forma un precipitado visible, que precipita hacia el fondo del tubo. La mayor dilución del suero que provoca aglutinación se llama el *título* del suero, y se utiliza como expresión semicuantitativa de la concentración de Ab para la comparación de sueros. Debe ser observado que las pruebas hechas solamente en una dilución de suero pueden dar resultados engañosos, debido a la carencia de la aglutinación tanto en la prozona así como en las diluciones altas del suero.

9. E. Benjamini, G. Sunshine y S. Leskowitz, "Immunology: A Short Course", Wiley-Liss, New York, 1996. pp. 115-118.

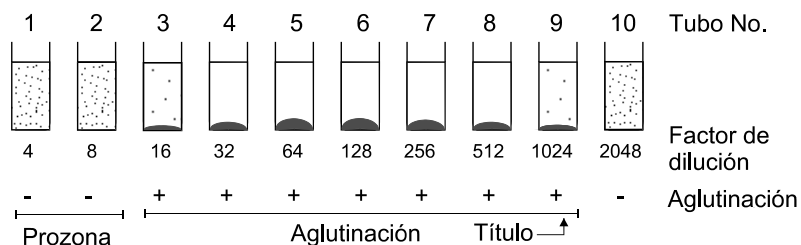
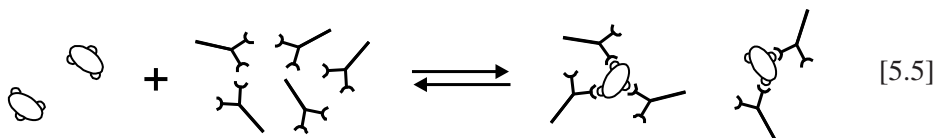
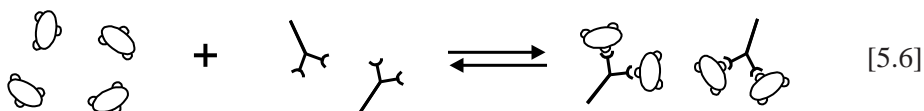


Figura 5.5. Prueba de aglutinación para detectar anticuerpos de *Brucella abortus*.⁹ Reprinted, by permission, from E. Benjamini, G. Sunshine and S. Leskowitz, “*Immunology: A Short Course*”, 3rd Edition, Wiley-Liss, New York, 1996. pp. 115-118. ISBN 0-471-59791-0. Copyright © 1996 by Wiley-Liss, Inc.

La aglutinación ocurre solamente sobre cierto rango de las diluciones del suero debido al exceso del antígeno o bien el exceso del anticuerpo. En la prozona, un gran exceso del anticuerpo está presente, de modo que cada anticuerpo se comporta univalentemente y no ocurre la reticulación (Eq 5.5):



A muy altas diluciones del suero, existe un exceso grande del antígeno, de modo que no hay bastante anticuerpo presente como para reticular al antígeno y causar la aglutinación. En este caso el antígeno se comporta de una manera univalente (Eq. 5.6):



Solamente en las diluciones intermedias las proporciones del anticuerpo y el antígeno permiten que ocurra una aglutinación significativa, de tal manera que sea visible.

La determinación de los grupos sanguíneos es un uso común de la prueba de aglutinación.¹⁰ Los eritrocitos humanos pueden poseer alguno de los epitopes llamados A y B en sus superficies. Los individuos que poseen solamente el epitope A tienen Anti-B en su suero, mientras que los individuos que poseen solamente el epitope B en sus eritrocitos tienen anticuerpos Anti-A en el suero. Algunos individuos no tienen ningún epitope, y ambos anticuerpos presentes, mientras que otros tienen ambos epitopes, y ningún anticuerpo. La Tabla 5.2 enumera los cuatro grupos sanguíneos principales, así como los epitopes y los anticuerpos presentes en su suero.

10. A. Nowotny, “*Basic Exercises in Immunochemistry*”, Springer-Verlag, New York, 1979. p. 219.

Grupo sanguíneo	Epitopes presentes en los eritrocitos	Anticuerpos presentes en el suero
AB	Ambos, A y B	No presentes Anti-A o Anti-B
A	Epitope A	Sólo Anti-B
B	Epitope B	Sólo Anti-A
0	No presentes A o B	Ambos, Anti-A y Anti-B

Tabla 5.2. Grupos sanguíneos humanos.

5.5.2 Reacciones de precipitación

Las reacciones de precipitación son similares en principio a las reacciones de aglutinación, con la diferencia de que el antígeno es una especie soluble, una especie molecular más bien que una partícula suspendida, tal como una bacteria o eritrocito. A determinada relación Ab:Ag, la red polimérica reticulada del anticuerpo y el antígeno pierde su solubilidad y forma un precipitado. Esta se denomina la reacción de la *precipitina*.¹¹ La Figura 5.6 muestra cómo la cantidad de precipitado producido varía con la cantidad de antígeno agregada, para una concentración total constante del anticuerpo.

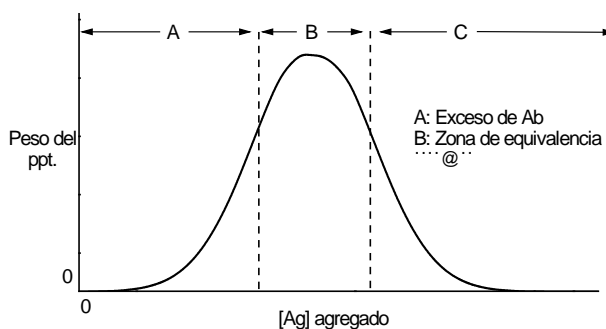


Figura 5.6. Formación de precipitina en función del agregado de antígeno.

Tres zonas son evidentes en la curva de la Figura 5.6. En las concentraciones bajas de antígeno, hay una zona de exceso de anticuerpo, en donde el anticuerpo se comporta univalentemente. En la zona de equivalencia, el antígeno y el anticuerpo están presentes en proporciones similares, por lo que se forma una gran cantidad de precipitado. En concentraciones más altas del antígeno, el antígeno se comporta univalentemente, y su

11. E. Benjamini, G. Sunshine y S. Leskowitz, "Immunology: A Short Course", Wiley-Liss, New York, 1996. pp. 121-122.

exceso no permite la formación de una red altamente reticulada, insoluble, por lo que no se forma precipitado.

La reacción de la precipitina se puede realizar en un gel, permitiendo realizar pruebas cualitativas para la presencia de ciertos anticuerpos en suero. Los geles usados son a menudo agar, que se preparan sobre una placa de cristal plana, tal como una placa portaobjeto de uso común en microscopia. El método denominado de la *doble-difusión*¹² utiliza un gel realizado sobre un portaobjeto, con dos pozos cortados en el gel, uno en cada extremo de portaobjeto. El suero desconocido se coloca en uno de los pozos, y la solución de antígeno a ser probado se coloca en el otro. Ambas soluciones difunden en el gel, dando lugar a dos gradientes opuestos de concentración. Si el anticuerpo sospechado está presente en el suero, entonces, a una cierta distancia entre los pozos, el cociente de la concentración de Ab:Ag será óptimo para la formación del precipitado. Según se muestra en la Figura 5.7, una línea de precipitina se forma en la zona de equivalencia de Ab:Ag. Si se agrega la condición de que los índices de difusión de diversos antígenos en el gel son conocidos, una prueba múltiple se puede conducir en un solo portaobjeto, con las posiciones de las líneas de precipitina indicando qué anticuerpos están presentes en la muestra de suero.

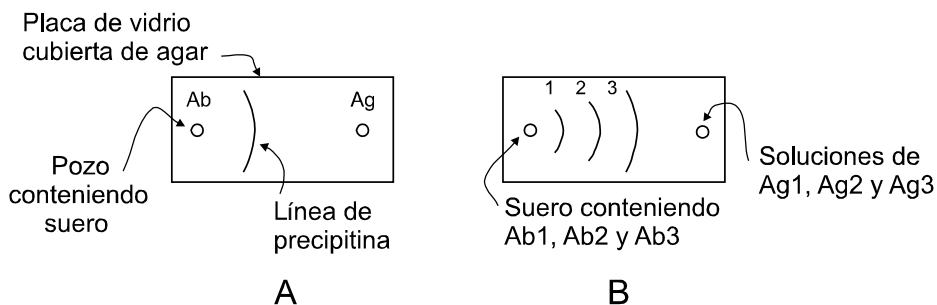


Figura 5.7. Método de doble difusión para un único Ab (A) y para múltiples anticuerpos (B). En B todos los Ags difunden a diferentes velocidades, siendo $1 > 2 > 3$.

El método de la doble-difusión es una prueba cualitativa más fácil que la reacción de la precipitina en solución, porque requiere solamente un gel, y no una serie de tubos de prueba con diluciones sucesivas del suero.

También existe un ensayo basado en el principio de la doble-difusión, para investigar la identidad de antígenos.¹³ En este ensayo, se cortan tres pozos en el gel de agar, según se observa en la Figura 5.8. El pozo central contiene un antisuero conocido, mientras que Ag1 está presente en una muestra incógnita. Ag2 es un antígeno estándar que se sospecha de ser idéntico con Ag1. Un semicírculo distintivo de precipitina se forma alrededor del pozo del anticuerpo si Ag1 y Ag2 son idénticos. Si los dos antígenos son totalmente diferentes,

12. G. Mancini, D.R. Nash y J.F. Heremans, *Immunochemistry* 7, 1970, 261-264.

13. A.J. Crowle, "*Immunodiffusion*", 2nd Ed., Academic Press, New York, 1973. pp. 247-303.

entonces dos arcos independientes de precipitina se formarán. La identidad parcial indica que un antígeno posee alguno, pero no todos los epitopes presentes en el otro; en la Figura 5.8, Ag2 posee algunos de los epitopes que posee Ag1, pero no es idéntico a Ag1.

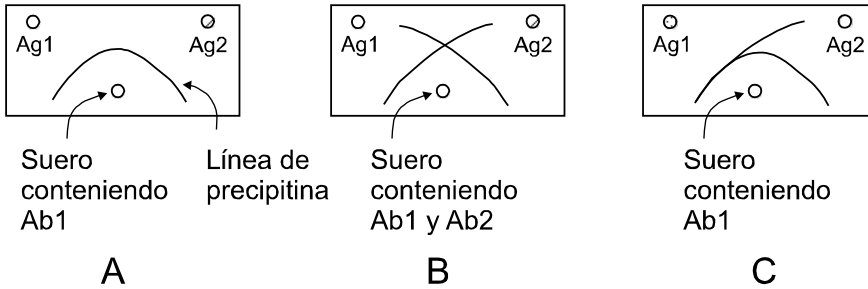


Figura 5.8. Método de doble difusión para detectar identidad antigénica: (A) identidad; (B) no-identidad; y (C) identidad parcial.

El ensayo denominado de *inmunodifusión radial simple (SRID)*¹⁴ es un análisis para cuantificar antígeno, que también se basa en la reacción de la precipitina. Esta prueba se realiza en un gel que contiene una concentración constante y uniforme de anticuerpo, ya que el anticuerpo se agrega a la disolución antes de su gelificación. Los pozos cortados en el gel contienen soluciones estándares de antígeno en diversas concentraciones. La precipitina producida después de que el Ag difunda en el gel forma un anillo alrededor de los pozos, según se muestra en la Figura 5.9, donde d^2 (diámetro²) es directamente proporcional a la $[Ag]$ en el pozo. Los valores de d son corregidos mediante la substracción del diámetro del pozo. Una curva de calibración de d^2 respecto a la $[Ag]$ se utiliza para la cuantificación del antígeno.

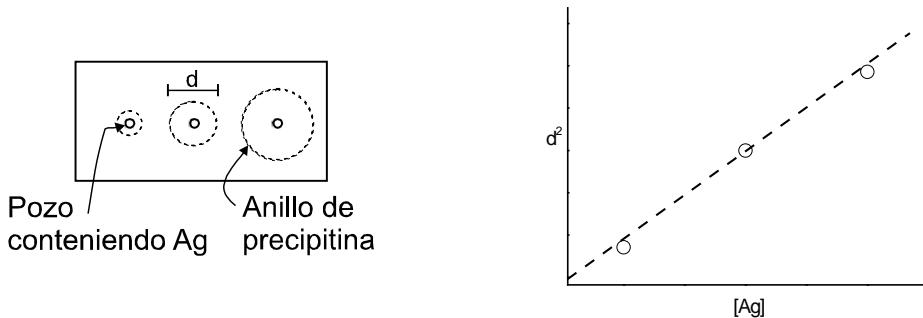


Figura 5.9. Método de inmunodifusión radial única para la cuantificación de antígeno.

Para obtener resultados precisos y cuantitativos empleando SRID se requiere que los pozos estén cortados reproduciblemente, y tengan paredes verticales, para producir los anillos

14. A.J. Crowle, "Immunodiffusion", 2nd Ed., Academic Press, New York, 1973. pp. 226-232.

típicos de esta técnica. Para facilitar las medidas, una vez que se forma la línea de precipitación, el gel ubicado sobre el cubreobjeto puede ser lavado durante unas 12 horas (overnight) con PBS para remover el Ab libre del gel, para luego teñir con un colorante genérico para proteínas, tal como azul de Coomassie (Coomassie Blue). Con esta técnica de teñido, límites de detección de antígeno del orden de 10^{-7} M han sido alcanzados.

Las reacciones secundarias, tales como la aglutinación y precipitación, se utilizan generalmente para identificar o realizar búsquedas rápidas (screening) para la presencia de ciertos anticuerpos o antígenos que se sospechen están presentes. Estas pruebas requieren que los antígenos sean polivalentes, o multideterminados, o poseer ambas características, para permitir que ocurra el entrecruzamiento. Las reacciones secundarias no se pueden utilizar para cuantificar o para identificar haptenos, puesto que los haptenos son siempre unideterminados y univalentes.

Las interacciones primarias antígeno-anticuerpo pueden ser utilizadas para cuantificar los antígenos y los haptenos. Métodos que utilizan las interacciones primarias han sido desarrollados tanto para cuantificar antígenos o haptenos, así como para anticuerpos. Estos métodos implican la combinación del anticuerpo con el antígeno, para luego determinar las concentraciones de reactivo libre y reactivo fijado. La competición entre un analito marcado (un reactivo) y un analito sin marcar (muestra incógnita) permite la cuantificación. Estos tipos de análisis son el tema del capítulo siguiente.

5.6 Lecturas sugeridas

- E. Harlow and D. Lane, “*Antibodies: A Laboratory Manual*”, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988.
- I.R. Tizard, “*Immunology: An Introduction*”, CBS (Saunders) College Publishing, New York, 1984.
- J.T. Barrett, “*Textbook of Immunology*”, 4th Ed., C.V. Mosby Company, St. Louis, 1983.

5.7 Problemas

1. Se dispone de dos preparaciones conteniendo un anticuerpo policlonal, producido según el método descrito en este Capítulo. Las preparaciones fueron ensayadas para determinar la concentración del anticuerpo midiendo su título. La preparación A posee un título de 1:1024, mientras que la preparación B tiene un título de 1:128. ¿Cuál es la preparación de anticuerpos más concentrada?

2. Explique porqué los diagramas de Scatchard para la unión de antígeno son lineares para los anticuerpos monoclonales, y curvados para los anticuerpos policlonales.

3. Cuáles de las combinaciones siguientes deberían producir una reacción de precipitina con una equivalencia cercana a 1:1 entre antígeno:anticuerpo:

- (a) Un antígeno univalente, multideterminado (epitopes A, B, C, y D) y Anti-A,
- (b) Un antígeno multivalente, unideterminado (epitope A) y Anti-A,
- (c) Un antígeno univalente, unideterminado (epitope A) y Anti-A, y
- (d) Un antígeno multivalente, multideterminado (epitopes A, B, C, y D) y Anti-A.

4. Una prueba de aglutinación para una bacteria fue realizada en diluciones seriadas de una muestra de agua dulce. Usando factores de dilución de 1:1 a 1:512, los resultados mostraron el aspecto de una zona de la aglutinación y de una zona de exceso del anticuerpo, pero no se observó en ningún caso la prozona. ¿Estaba la bacteria presente? ¿Por qué no se observó en alguna dilución la prozona?

5. En una prueba de aglutinación para una bacteria utilizando el método de doble difusión, representada en la Figura 5.7, se observa una línea de precipitina, con forma de arco y más cerca al pozo del Ab que del de Ag, y curvando hacia el pozo de Ab. Estos resultados son esperados si el coeficiente de difusión de Ag a través del gel es mucho más rápido que el del Ab. ¿Cuál sería el aspecto de la línea de precipitina si el Ab hubiera difundido mucho más rápidamente que el Ag (por ejemplo, si el Ag fuera una especie de muy alto peso molecular)?

CAPÍTULO 6

INMUNOENSAYOS CUANTITATIVOS UTILIZANDO MARCADORES (LABELS)

6.1 Introducción

Los inmunoensayos cuantitativos constituyen un grupo enorme de técnicas de análisis diseñadas para la cuantificación selectiva de especies de bajo y alto peso molecular, a niveles de traza, en medios bioquímicos complejos. En estos métodos inmunológicos, *el ligando (antígeno o hapteno) es casi siempre el analito*; para la identificación cualitativa de anticuerpos desconocidos, a menudo de importancia clínica, los resultados cuantitativos exactos normalmente no son requeridos. En este Capítulo, el término ligando es utilizado para referirse tanto a haptenos como a antígenos, dado que las reacciones de unión secundarias no son parte de las reacciones involucradas en el proceso analítico. Los inmunoensayos cuantitativos explotan las uniones primarias entre el anticuerpo y el ligando, esto es, el reconocimiento y la combinación del paratope del anticuerpo con el epitope del antígeno, con la afinidad intrínseca K . Las reacciones de unión secundarias generalmente no ocurren, inclusive con los antígenos macromoleculares, debido a que un importante exceso del anticuerpo o del ligando está generalmente presente. En la práctica, sin embargo, la posibilidad de interacciones secundarias debe ser considerada durante el desarrollo de nuevos inmunoensayos.

La clasificación de los inmunoensayos se basa en (a) si son homogéneos, sin necesidad de un paso de lavado o separación antes de realizar las mediciones, o heterogéneos, donde se requiere un paso de separación; (b) cuál de las especies, anticuerpo o antígeno, es marcado; y (c) el tipo de marca empleada.

La marca ideal para los métodos basados en inmunoensayos tiene las características siguientes. Es de bajo costo, segura, y los procedimientos de marcado son simples y rápidos. Se une covalentemente al reactivo del ensayo en sitios múltiples, posibilitando alta sensibilidad. La especie marcada es estable. El proceso de marcado tiene un efecto mínimo en el comportamiento y afinidad específica, es decir, los reactivos marcados y sin marca se comportan idénticamente con respecto a la unión anticuerpo-antígeno. La marca se detecta fácilmente, posibilitando la utilización de instrumentación barata que puede ser automatizada fácilmente. Finalmente, la marca debe tener características que permitan la diferenciación de las formas libres y unidas sin requerir un paso de separación.

VI. INMUNOENSAYOS CUANTITATIVOS UTILIZANDO MARCADORES (LABELS)

Mientras que ningún tipo de marca verdadera resuelve todas estas necesidades, las características de algunos de los sistemas de marcado más recientemente introducidos se están acercando al ideal. Los radioisótopos, en tiempos pasados el único tipo de marca utilizado para los inmunoensayos, han sido superados claramente por los métodos de marcado más modernos basados en marcas fluorescentes, enzimáticas y de grupos prostéticos. Una variedad de marcas alternativas, incluyendo los glóbulos rojos, las partículas de látex, los virus, los metales y los radicales libres, también han sido investigadas. La Tabla 6.1 muestra un listado representativo de las marcas usadas en los inmunoensayos modernos.¹

Tipo de inmunoensayo	Tipo de marca	Marca	Propiedad medida
Heterogéneo	Fluoróforo	Fluoresceína	Intensidad de fluorescencia
		Quelato de europio	Fluorescencia resuelta en el tiempo
		Ficobiliproteínas	Intensidad de fluorescencia
	Quimioluminiscentes	Ester de acridina	Ester hidrólisis
		Ester de fenantrolina	Ester hidrólisis
	Enzima	Fosfatasa alcalina	Actividad enzimática
		β -Galactosidasa	Actividad enzimática
		Peroxidasa	Actividad enzimática
		Ureasa	Actividad enzimática
	Cofactor	ATP	Actividad quinasa
NAD		Actividad deshidrogenasa	
Agente lítico	Melitina	Liberación de enzimas atrapadas en lisosomas (actividad)	
Marca secundaria	Biotina	Une avidina-enzima y estreptavidina-enzima conjugados (actividad)	
Homogéneo	Fluoróforo	Fluoresceína	Polarización de fluorescencia
			Apagamiento de fluorescencia
			Transferencia de energía de fluorescencia
	Quimioluminiscentes	Ester de acridina	Ester hidrólisis
		Isoluminol	Emisión de luz
	Grupo prostético	FAD	Actividad de glucosa oxidasa
		Enzima	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
	Malato deshidrogenasa		Actividad enzimática
	Peroxidasa		Agregación y actividad enzimática
	Hexoquinasa		Canalización de sustrato (Substrate channeling)
	Electroactividad	Ferrocenos	Corriente de oxidación
Marca de espin	Nitroxidos	Ensanchamiento de la señal de ESR (resonancia de espín electrónico)	
Substrato	Galactosil-umbeliferona	Hidrólisis enzimática	

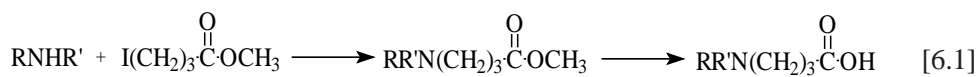
Tabla 6.1. Marcas usadas en inmunoensayos.¹

1. R.M. Nakamura, Y. Kasahara y G.A. Rechnitz, Eds., "Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s", American Society for Microbiology, Washington DC, 1992.

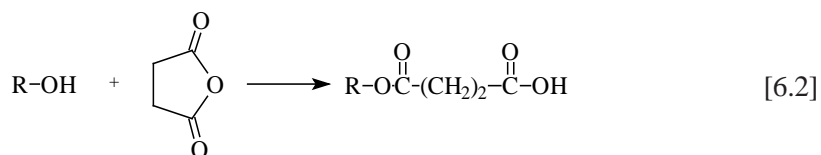
6.2 Reacciones de marcado

Los reactivos usados para el marcado de las proteínas antigénicas y de los anticuerpos son similares a los usados para la inmovilización de enzimas, mediante métodos que originan enlaces covalentes y aquellos que producen entrecruzamiento (ver Capítulo 4). Reactivos entrecruzantes homobifuncionales y heterobifuncionales son comunes, usando grupos NHS ester, maleimido, aldehído, tiocianato e isotiocianato; la elección de distintos grupos permite proporcionar selectividad al proceso. Las glicoproteínas tales como los anticuerpos también pueden ser unidos a marcas que posean grupos amino mediante la oxidación inicial de los residuos del azúcar por peryodato; los grupos aldehído que resultan forman bases de Schiff con las aminas primarias, que posteriormente pueden ser reducidas a aminas secundarias, bajo condiciones suaves de reacción con sodio borohidruro.² Luego de realizar las reacciones de condensación, los reactivos macromoleculares marcados son purificados generalmente por cromatografía de filtración en gel: la fase fija porosa retiene los solutos pequeños, mientras que las especies de alto peso molecular son eluidos sin sufrir retención en la fase móvil, formada por una solución buffer. Diálisis o cromatografía de afinidad también pueden ser utilizadas para la purificación del conjugado.

La preparación de haptenos marcados puede realizarse bajo condiciones más extremas, dado que los cuidados relativos a evitar la desnaturalización proteica solo deben ser considerados si la marca es una enzima. El primer paso crítico para el marcado de un hapteno es la introducción de un grupo reactivo sobre el hapteno. Esto puede hacerse por alquilación de los substituyentes O o N con haloesteres,³ seguidos por hidrólisis (Eq. 6.1):



A continuación, una reacción convierte los grupos hidroxilo en grupos carboxilatos utilizando anhídrido succínico (Eq. 6.2):⁴



Alternativamente, grupos cetona pueden ser utilizados para generar grupos carboxilato reactivos (Eq. 6.3):⁵

2. P.K. Nakane, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **254**, 1975, 203-211.

3. J.B. Gushaw, M.W. Hu, P. Singh, J.G. Miller y R.S. Schneider, *Clin. Chem.* **23**, 1977, 1144.

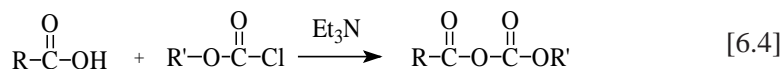
4. B.F. Erlanger, *Pharmacol. Rev.* **25**, 1973, 271-280.

5. B.F. Erlanger, F. Borek, S.M. Beiser y S. Lieberman, *J. Biol. Chem.* **228**, 1957, 713-727.

VI. INMUNOENSAYOS CUANTITATIVOS UTILIZANDO MARCADORES (LABELS)



Después de la introducción de un grupo carboxílico sobre el hapteno, una variedad de reactivos pueden ser utilizados para activar a estos grupos hacia nucleófilos, tales como grupos amina primarios. El método del anhídrido mixto (mixed-anhydride method) utiliza isobutilcloroformato⁶ para generar un anhídrido mixto en presencia de una base tal como trietilamina (Eq. 6.4):



El producto de la reacción del anhídrido mixto es reactivo hacia grupos amino primarios, así como hacia grupos oxidrilo, pero es susceptible a la hidrólisis. Un rendimiento de 20%-30% para el proceso de conjugación ha sido obtenido usando un exceso de unas 10 a 20 veces de isobutilcloroformato.

Los ácidos carboxílicos también pueden ser activados usando carbodiimida y los reactivos carbodiimida/hidroxisuccinimida, según lo descrito en el Capítulo 4 para la inmovilización de enzimas. Utilizando solo la reacción de la carbodiimida, rendimientos promedio del proceso de conjugación del 20% han sido informados, debido a la competición de una reacción lateral que convierte el intermediario O-acilisourea a N-acilurea, un compuesto estable. Los ésteres de NHS pueden ser generados *in situ* y reaccionar directamente con la marca; para la reacción de la progesterona + β -galactosidasa, una pérdida del 10% en actividad fue informada, y se ha encontrado que solo el 26% de la enzima activa es inmunoreactiva. Sin embargo, la estabilidad del éster de NHS permite su aislamiento y purificación; el éster purificado de NHS de la progesterona, después de la reacción con la enzima, produce un conjugado inmunoreactivo de enzima-hapteno con un rendimiento del 100%, en el que el cociente molar de esteroide:enzima fue encontrado igual a 2:1.⁷ Se ha establecido que un exceso del reactivo bifuncional carbodiimida produce la desactivación de muchas enzimas cuando se utiliza el método *in situ*, y el aislamiento del intermediario del éster de NHS permite el control directo sobre la estequiometría del paso de condensación.

Cuando se realiza una conjugación, la eficacia del proceso es evaluado generalmente determinando el cociente molar de hapteno:marca o de anticuerpo:marca, y examinando las características de la marca, para determinar si la conjugación ha producido los resultados requeridos. Por ejemplo, la actividad específica de la enzima marcada es cuantificada, y tanto la absorbividad molar como el rendimiento cuántico de las marcas fluorescentes son

6. B.F. Erlanger, F. Borek, S.M. Beiser y S. Lieberman, *J. Biol. Chem.* **234**, 1959, 1090-1094.

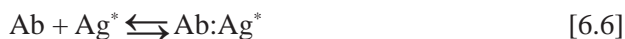
7. D. Exley y R. Abuknesha, *FEBS Lett.* **79**, 1977, 301-304.

determinadas antes y después de la conjugación. Las marcas enzimáticas pueden ser protegidas contra la desactivación incluyendo un inhibidor competitivo en la mezcla de reacción durante la conjugación; la presencia de esta especie puede proteger a grupos reactivos en el sitio activo, evitando su modificación.⁸ La inmunoreactividad, es decir, la fracción del conjugado hapteno-marca o anticuerpo-marca que se puede unir a un exceso de anticuerpo o antígeno, respectivamente, se utiliza a menudo para caracterizar un reactivo marcado; la afinidad de las uniones también pueden ser determinadas.

Las reacciones antedichas han sido dadas como ejemplos de los métodos usados para ligar haptenos y anticuerpos a compuestos marcadores detectables; un listado exhaustivo de los procedimientos para realizar la conjugación está más allá del alcance de este trabajo.

6.3 Inmunoensayos heterogéneos

Muchos inmunoensayos requieren un paso de lavado antes de la cuantificación, con el objetivo de separar las fracciones unidas y libres de la especie marcada. Considere un inmunoensayo en el que un ligando marcado, Ag^* , compite con el analito sin marca, Ag , para una cantidad limitada de sitios de unión del anticuerpo. Este equilibrio competitivo es representado por las Eqs. 6.5 y 6.6, abajo:



Asumiremos que la presencia de la marca no tiene ningún efecto en la afinidad del anticuerpo por el ligando. Cuando el equilibrio ha sido alcanzado, la mezcla de reacción contiene Ag , Ag^* , $Ab:Ag$, y $Ab:Ag^*$. Debido a que la cantidad presente del Ab es baja respecto a las cantidades de Ag y Ag^* , esencialmente no queda ningún Ab libre. Si la marca en si misma no es afectada por la unión del anticuerpo, es necesario un proceso de separación de las fracciones unidas y libres para determinar el grado de unión de la especie etiquetada. La separación puede ser lograda agregando un paso de precipitación, o conduciendo el análisis con anticuerpos inmovilizados sobre soportes o partículas sólidas.

Los métodos de precipitación emplean sales o solventes para precipitar la fracción ligada, es decir $Ab:Ag$ y $Ab:Ag^*$, de la mezcla de reacción. Si esta fracción ligada es grande o bastante inestable como para precipitar espontáneamente, se agrega simplemente un paso de centrifugación o de filtración para separarla. Más a menudo, sulfato de amonio o etanol son utilizados para promover la precipitación. La precipitación puede ser realizada

8. G.L. Nicolson y S.J. Singer, *J. Cell Biol.* **60**, 1974, 236-248.

VI. INMUNOENSAYOS CUANTITATIVOS UTILIZANDO MARCADORES (LABELS)

usando un segundo anticuerpo, por ejemplo, anti-IgG preparado inoculado un animal con IgG proveniente de otra especie. El alto peso molecular de $Ab_2:Ab_1:Ag$ y $Ab_2:Ab_1:Ag^*$ da como resultado una precipitación cuantitativa más rápida y fácil. El polietilenglicol (PEG) también puede ser agregado para rendir precipitados con partículas de menor peso molecular, aumentando la velocidad y la especificidad del proceso de precipitación.

Los inmunoensayos modernos emplean anticuerpos inmovilizados sobre soportes sólidos. Los anticuerpos se unen fuertemente y espontáneamente al vidrio y a algunos plásticos. Pueden ser unidos así a partículas granulares, a tubos y columnas, o a los pozos de las placas multipozo. Estas placas, mostradas en la Figura 6.1, consisten en ocho filas y doce columnas de pozos, y son generalmente producidas por inyección de poliestireno en moldes. Sobre el poliestireno los anticuerpos y otras proteínas se fijan por adsorción irreversiblemente. Las dimensiones estándares para estas placas son de 86 milímetros de ancho, 128 milímetros de largo, con pozos de 7 milímetros de diámetro y un volumen de entre 0,3-0,4 mL.

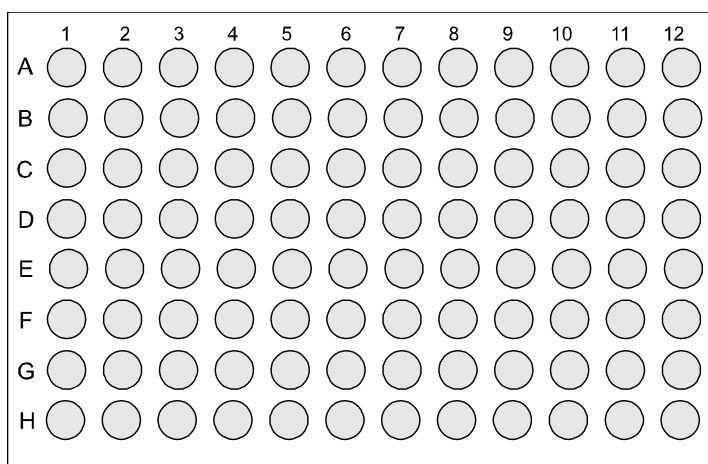


Figura 6.1. Placa multipozo utilizada en inmunoensayos automatizados.

La inmovilización del anticuerpo sobre un soporte sólido da como resultado que toda especie que se una al anticuerpo ($Ab:Ag$ y $Ab:Ag^*$) también resulte inmovilizada. El material que no se une puede ser fácilmente removido, (a) como un sobrenadante luego de una etapa de centrifugación, si la fase sólida es particulada; (b) mediante elución o lavado, si la fase sólida es la pared de un tubo o una columna empacada con partículas sólidas; o (c) mediante decantación y lavado, si la fase sólida es una placa multipozo. Estos métodos requieren que la unión covalente o la adsorción del anticuerpo a la fase sólida sea *reproducible e irreversible*.

Una fase sólida novedosa usada por tres fabricantes de inmunoensayos comerciales (kit) emplea el anticuerpo unido covalentemente a partículas de celulosa que contienen un núcleo

de óxido de hierro(III).⁹ Estas partículas pequeñas, paramagnéticas, no sedimentan espontáneamente, y tienen una gran área superficial. Las partículas son retenidas magnéticamente dentro del tubo durante la etapa de decantación y los pasos de lavado, permitiendo una fácil separación de la fracción unida luego de alcanzar el equilibrio con el Ag y Ag*.

6.3.1 Métodos utilizando anticuerpo marcado

Los métodos que marcan al anticuerpo confían en la presencia de un exceso importante del anticuerpo marcado. Este anticuerpo se incubó con concentraciones estándares de antígeno agregado (el analito), determinándose la concentración del anticuerpo ligado. La curva de calibración que resulta es lineal, según se muestra en la Figura 6.2A, donde la linealidad se extiende en el rango superior hasta las concentraciones donde Ab* ya no está en exceso. Incluso para concentraciones muy bajas de antígeno, si un exceso de Ab* está presente, una cierta cantidad del complejo se formará; en principio, incluso una sola molécula de Ag puede ser detectada.¹⁰

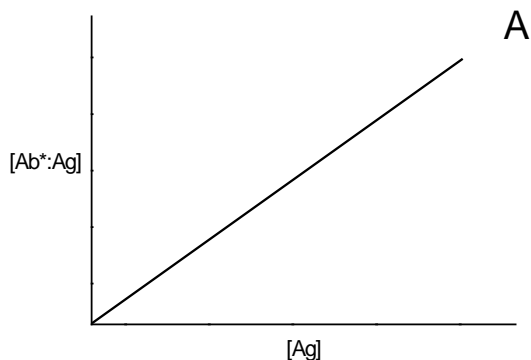


Figura 6.2. (A) Curvas de calibración para antígeno utilizando métodos con anticuerpo marcado.

Los análisis de tipo emparejado (sandwich assays) emplean dos anticuerpos, y son útiles para los ligandos que poseen dos o más epítopes distintos. El anticuerpo primario, o anticuerpo sin marcar, se inmoviliza sobre un soporte sólido, y debe estar presente en exceso respecto a la cantidad total de Ag presente tanto en estándares como en las muestras incógnitas. Después de la incubación con el antígeno, para permitir una captura cuantitativa del Ag, y un paso de lavado, el anticuerpo marcado se agrega en exceso, y se procede a una segunda incubación. El anticuerpo marcado reacciona únicamente con el antígeno que ha sido retenido en la fase sólida por el anticuerpo primario. Después de un segundo lavado, la

9. J.L. Guesdon y S. Avrameas, *Immunochemistry* **14**, 1977, 443-447.

10. R.M. Nakamura, A. Voller y D.E. Bidwell en "Handbook of Experimental Immunology, Volume 1: Immunology", 4ª Ed., D.M. Wier, Ed., Oxford (Blackwell Scientific), New York, 1986. pp. 27.1-27.20.

cantidad de Ab:Ag:Ab^* inmovilizado en el “emparedado” es entonces determinado, siendo proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra.

6.3.2 Métodos utilizando ligando marcado

En inmunoensayos utilizando ligando marcado, una cantidad limitante de anticuerpo reacciona con el antígeno marcado, el que se encuentra en exceso (Ag^*), en presencia de concentraciones variables del analito Ag . Generalmente, la cantidad total de anticuerpo usada es aquella cantidad requerida para producir la unión del 50% del ligando marcado en ausencia del analito, o ligando sin marcar. El Ag sin etiqueta inhibe la unión del Ag^* con el anticuerpo, debido a que el equilibrio es competitivo. Una serie de concentraciones estándar de Ag son utilizadas para construir una curva de inhibición, según se muestra en la Figura 6.2B; entonces, la $[\text{Ag}]$ en una muestra incógnita puede ser determinada por el grado de inhibición de la formación de Ab:Ag^* . Los límites de detección obtenidos con este método dependen de la afinidad del anticuerpo para el antígeno, y la incertidumbre experimental en la cuantificación de la fracción libre o unida del antígeno marcado.¹⁰ Para un valor de K_o de 10^{12} M^{-1} , un límite de detección del antígeno de 10^{-14} M ha sido alcanzado.

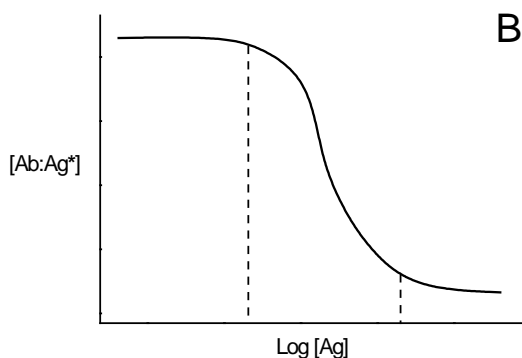


Figura 6.2. (B) Curvas de calibración para antígeno utilizando métodos con ligando marcado, donde las líneas punteadas muestran las zonas analíticamente útiles de las curvas.

Por ejemplo, un radioinmunoanálisis (RIA) se ha desarrollado para la hormona lactógeno placentaria humana (HPL).¹¹ HPL es una hormona proteica secretada por la placenta. Los niveles de HPL han sido utilizados como indicadores de la función placentaria normal durante el embarazo. Esta hormona es antigénica, y los anticuerpos pueden ser producidos inmunizando un animal con la proteína humana. La HPL es marcada por iodinación con ^{125}I en sus residuos de tirosina, para dar lugar a un antígeno marcado, HPL^* . Esta especie

11. D. Hawcroft, T. Hector y F. Rowell, “*Quantitative Bioassay*”, Wiley, New York, 1984, pp.158-159.

marcada es un emisor de rayos gamma de baja energía. La Figura 6.3 muestra someramente el procedimiento de análisis. Una cantidad fija de HPL* y la HPL de la muestra incógnita son incubados con una cantidad fija y escasa de anticuerpos anti-HPL. Se produce entonces una competición para unirse a los sitios disponibles del Ab, y después de un período fijo de incubación, la fracción ligada es precipitada por la adición de etanol. Luego de la centrifugación, la radiactividad en el precipitado o en el sobrenadante es medida.

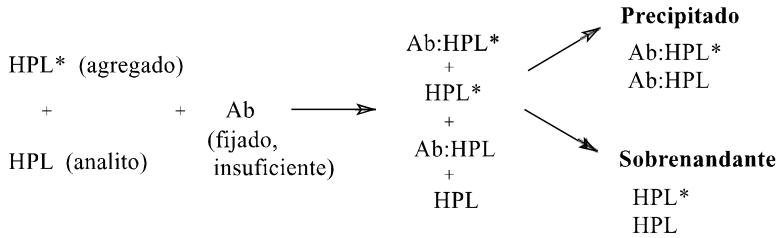


Figura 6.3. Esquema de un ensayo RIA para la hormona lactógeno placentaria humana (HPL).

Las curvas estándares son construidas graficando radiactividad versus $\log[\text{HPL}]$, según se muestra en la Figura 6.4. Si se mide la radiactividad del precipitado, entonces la señal medida disminuye mientras que la concentración de HPL aumenta, puesto que pocas moléculas de HPL* tendrán acceso a los sitios de unión en el anticuerpo. Si se cuantifica la radiactividad en el sobrenadante, ocurrirá entonces lo contrario. Ambas curvas exhiben una forma sigmoidea, y la posición del punto medio de la curva respecto al eje de $\log[\text{HPL}]$ depende de la afinidad K_0 del anticuerpo.

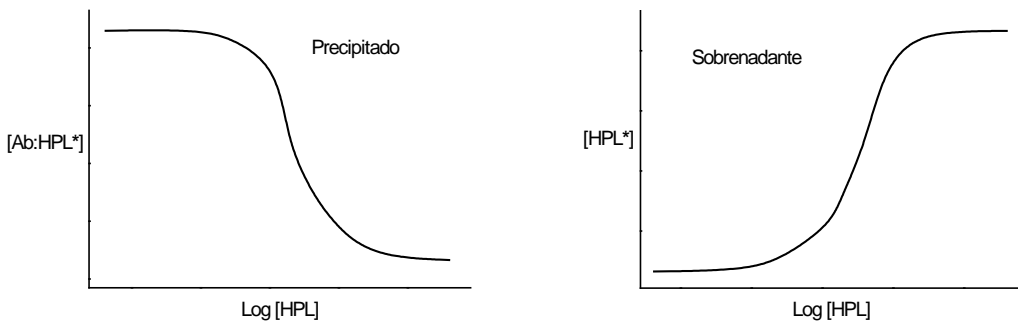


Figura 6.4. Curvas de calibración para HPL.

Para mediciones cuantitativas, estas curvas sigmoideas pueden ser linealizadas usando la transformación logit. Primero, las señales medidas se normalizan a valores ubicados entre cero y uno. La transformación utilizando la función logit entonces puede ser realizada, $\text{logit}(y) = \ln\{y/(1-y)\}$. Si y es la fracción de la marca en el sobrenadante, entonces un diagrama de $\text{logit}(y)$ versus $\log[\text{HPL}]$ será lineal con una pendiente negativa, según lo detallado en el

Capítulo 16. Si la radiactividad del precipitado se mide, después de la transformación logit rendirá una línea recta con una pendiente positiva.

6.3.3 Radioisótopos

Debido a que los radioisótopos fueron las primeras marcas usadas en inmunoensayos, existe un extenso arsenal de radioinmunoanálisis. Los radioisótopos se detectan fácilmente en niveles bajos, y los procedimientos de marcado son simples. La marca no tiene virtualmente ningún efecto en la interacción entre el anticuerpo y el antígeno. Sin embargo, los radioisótopos son costosos, peligrosos, y requieren procedimientos incómodos de supervisión, manejo y disposición. Además, el decaimiento isotópico hace necesario el reemplazo regular del componente etiquetado.

En general, se utiliza ^{125}I como marcador para proteínas antigénicas grandes.¹² Tiene un período de vida media de 60 días, es un emisor gamma de baja energía, requiriendo instrumentación de bajo costo para su detección. ^3H se utiliza comúnmente para marcar haptenos. Tiene un período de vida media de 12 años y es un emisor beta, por lo que requiere la utilización de un contador del centelleo para la detección, equipos complejos y costosos. Otra desventaja del ^3H es que tiene una actividad específica baja, por lo que los límites de detección obtenidos son pobres cuando se los compara con la utilización de ^{125}I . Algunos análisis especializados emplean isótopos del Co, Fe, y Se.

Los límites de detección de los ensayos RIA para detectar antígenos son del orden de 10^{-12} M, y son igualados únicamente por los marcadores enzimáticos, puesto que las enzimas son capaces de la amplificación catalítica de la señal.

6.3.4 Fluoróforos

Las marcas fluorescentes comúnmente utilizadas¹³ incluyen los derivados de la fluoresceína, rodamina y umbeliferona (Figura 6.5). Recientemente, un grupo de proteínas aisladas de algas se ha utilizado como marcadores en inmunoensayos debido a sus altas absorbancias molares (por lo menos diez veces mayor que la fluoresceína) y a sus rendimientos cuánticos, superiores a 0,8; éstas son las ficobiliproteínas, tales como la ficoeritrina, ficocianina y alofococianina. Las marcas fluorescentes son seguras, y no requieren ninguna licencia para su uso. Límites de detección de los antígenos cercanos a 10^{-10} M son normales utilizando marcadores fluorescentes, dos órdenes de magnitud superiores a los obtenidos utilizando marcadores radiactivos, como resultado de la dispersión (scattering), apagamiento (quenching), y de la

12. T.M. Jackson y R.P. Ekins, *J. Immunol. Meth.* **87**, 1986, 13-20.

13. I. Hemmila, *Clin. Chem.* **31**, 1985, 359-370.

fluorescencia de fondo de las muestras biológicas, especialmente aquellas que contienen cantidades significativas de proteína. Los marcadores fluorescentes ofrecen muchas opciones para la generación de la señal en los inmunoensayos heterogéneos,¹⁴ ensayos que pueden ser clasificados como métodos indirectos, competitivos o de tipo sándwich.

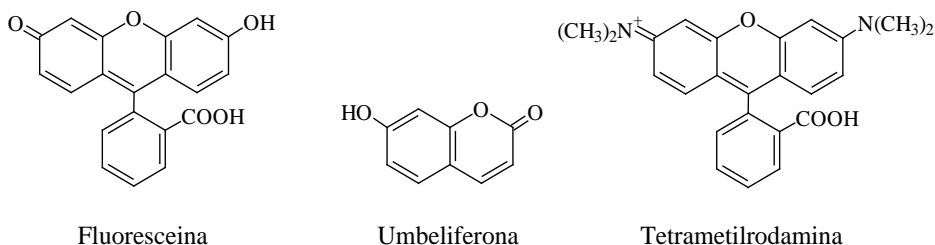


Figura 6.5. Marcas fluorescentes utilizadas comúnmente en inmunoensayos.

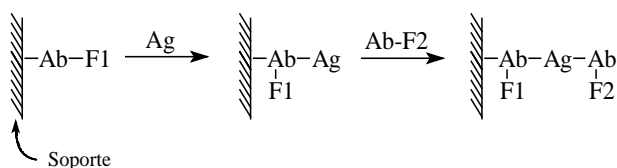
Fluorescencia Indirecta. Este método se utiliza normalmente para la cuantificación o para ensayos cualitativos rápidos (screening) de anticuerpos. El antígeno se inmoviliza sobre un soporte sólido, y se agrega el antisuero. Si los anticuerpos específicos están presentes, estos anticuerpos serán inmovilizados sobre el soporte. Después de un paso de lavado, los anticuerpos hacia el determinado tipo de anticuerpo utilizado son agregados, marcados con el fluoróforo (por ejemplo anti-IgG-fluoresceína). Estos anticuerpos marcados serán inmovilizados únicamente si los anticuerpos primarios al antígeno inmovilizado están presentes en el soporte sólido. De esta manera, la intensidad de la fluorescencia aumentará con la concentración del anticuerpo específico.

Fluorescencia Competitiva. Los anticuerpos para el antígeno o hapteno (analito) se inmovilizan sobre un soporte sólido. El antígeno marcado con el fluoróforo y sin marca compete para un número limitado de los sitios de unión del anticuerpo. El soporte se lava, y se mide la fluorescencia. Concentraciones más altas del analito dan lugar a menos especie marcada inmovilizada, rindiendo una intensidad de la fluorescencia reducida.

Fluorescencia en Sándwich. Este método no se adapta fácilmente al análisis de haptenos, debido a que el antígeno debe ser bastante grande, y poseer por lo menos dos epitopes distintos, para permitir el ligamiento independiente de dos anticuerpos distintos. El anticuerpo primario inmovilizado se incuba el tiempo necesario para permitir la unión cuantitativa del antígeno (analito) presente en la muestra. Luego se agrega el segundo anticuerpo, marcado con el fluoróforo, para formar un “sándwich” con las siguientes capas: Soporte – anticuerpo – antígeno – anticuerpo – fluoróforo. El fluoróforo resulta inmovilizado únicamente si el antígeno está unido al anticuerpo primario. La intensidad de la fluorescencia aumenta linealmente con la cantidad de antígeno presente en la muestra.

14. D.S. Smith, M.H.H. Al-Hakim y J. Landon, *Ann. Clin. Biochem.* **18**, 1981, 253-274.

Transferencia de Excitación de Fluorescencia. Este es una modificación del método sándwich, como se observa en la Eq. 6.7, en el que se marcan *ambos* anticuerpos, pero con distintos fluoróforos (F1 y F2), que son elegidos de modo que el espectro de emisión de uno se superponga con el espectro de excitación del otro. Debido a ello, “apagamiento” (internal quenching) ocurre cuando F1 y F2 se encuentran próximos. Si F1 y F2 están cercanos, la emisión de F1 es apagada por la absorción de F2. Después de un paso de lavado, la emisión de F1 es medida; mediante esta técnica, cuando aumenta la concentración de antígeno, la intensidad de emisión disminuye.



Utilizando esta metodología, un “análisis sándwich de dos sitios” para determinar digoxina, donde la ficoeritrina se utiliza como F1 y la fluoresceína como F2 ha sido desarrollado.¹⁵ La ficoeritrina se aísla de algas rojas, tiene un rendimiento cuántico de 0,80 y absorbe treinta veces más luz que la fluoresceína. El anticuerpo primario marcado con ficoeritrina se inmoviliza en las paredes de los pozos de una placa multipozo. Luego de un periodo de incubación con la muestra que contiene digoxina, de tal manera de permitir la unión cuantitativa de la digoxina, el segundo anticuerpo marcado con fluoresceína se agrega. La fluoresceína apaga la emisión de la ficoeritrina, según se muestra en la Figura 6.6, de modo que mayores cantidades de digoxina inmovilizada producen menores intensidades de emisión. Este análisis tiene un límite de detección de 0,5 mg/L de digoxina, con un coeficiente de variación del 6%:

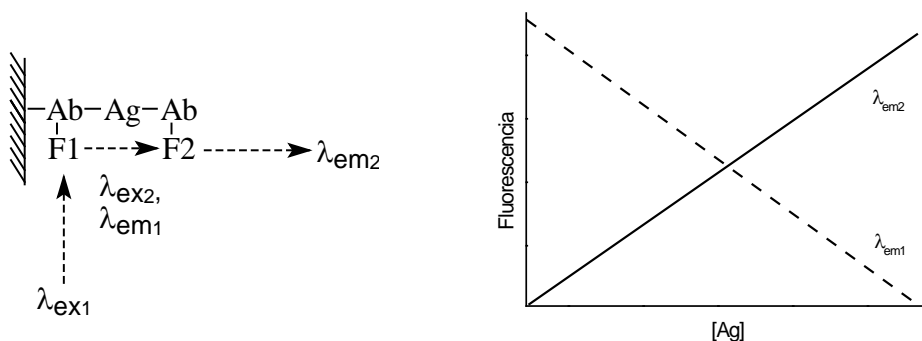


Figura 6.6. Transferencia de excitación de fluorescencia en un ensayo de tipo emparedado.

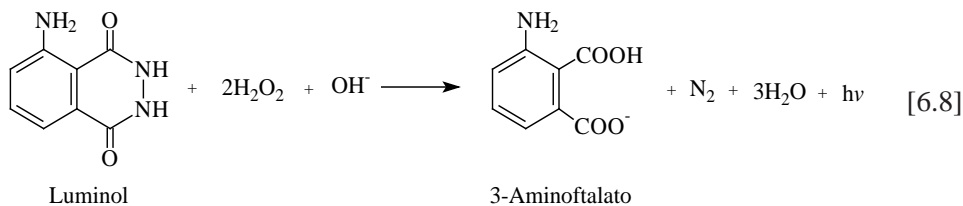
Fluorescencia Resuelta en el Tiempo. Esta técnica instrumental puede ser aplicada a la mayoría de los inmunoensayos que requieran medidas de la intensidad de la fluorescencia.

15. D. Hawcroft, T. Hector y F. Rowell, “*Quantitative Bioassay*”, Wiley, New York, 1984, p. 172.

Su popularidad proviene de que la técnica rechaza en gran medida las señales fluorescentes interferentes y la radiación de excitación dispersada. Si una mezcla de fluoróforos de breve y larga vida de fluorescencia se excita con un corto pulso de luz ($< 1 \mu\text{s}$), las moléculas excitadas emitirán fluorescencia, de acuerdo a su naturaleza, durante relativamente poco o mucho tiempo. En ambos casos, la fluorescencia decaerá exponencialmente con tiempo, pero la fluorescencia de breve duración decaerá a casi cero muy rápidamente. Si las medidas de la emisión se toman después de 100-200 μs , sólo la fluorescencia de larga vida será medida. La fluorescencia de breve duración y la luz dispersada se pueden eliminar de esta manera de las señales medidas. El fluoróforo utilizado como marca debe poseer un estado excitado duradero, y solamente algunas especies, notablemente los quelatos de europio, tienen convenientes propiedades de emisión de fluorescencia.¹⁶ Las proteínas marcadas con para-isotiocianatofenil-EDTA (para-isothiocyanatophenyl-EDTA) en los residuos de lisina forman quelatos con Eu^{3+} con constantes de formación mayores a 10^{12}M^{-1} . Típicamente, un pulso de excitación de 1 μs a una longitud de onda de 337 nm es seguido por un tiempo de espera de 200 μs , luego de ello la emisión de fluorescencia duradera se integra a 613 nm entre 200 y 600 μs . La fluorescencia duradera proveniente del poliestireno (usado para las placas multipozo) es extremadamente baja, pero otros materiales utilizados como soporte sólido, tales como nitrocelulosa y papel 3M, exhiben emisiones de fluorescencia duraderas que interfieren (producen una señal de fondo, o background) en los ensayos utilizando esta técnica.

6.3.5 Marcadores quimioluminiscentes

Los marcadores quimioluminiscentes se pueden emplear en análisis tipo sándwich o análisis competitivos para la detección de antígeno. En los análisis tipo sándwich, un soporte sólido sostiene un anticuerpo primario, y la incubación con el ligando rinde una especie que puede ser detectada después de un segundo paso de incubación, con un segundo anticuerpo marcado. El luminol ha sido probado como marcador en inmunoensayos; puede ser unido covalentemente a las proteínas a través de su grupo amino primario. El luminol reacciona con el peróxido de hidrógeno e hidróxido en una reacción catalizada por microperoxidasa, que produce luz a 430 nm (Eq. 6.8):



16. E.P. Diamandis y T.K. Christopoulos, *Anal. Chem.* **62**, 1990, 1149A-1157A.

VI. INMUNOENSAYOS CUANTITATIVOS UTILIZANDO MARCADORES (LABELS)

Después del segundo paso de incubación y lavado en el inmunoensayo tipo sándwich, el Ab:Ag:Ab-Luminol inmovilizado es detectado por adición de OH^- y microperoxidasa, seguida de la adición de H_2O_2 al medio de reacción. La luz emitida luego del agregado de peróxido se integra por un período definido (5-10 s), según se muestra en la Figura 6.7. Puesto que éste es un método basado en anticuerpos marcados y no competitivo, la intensidad de luz integrada aumenta linealmente con la concentración del antígeno.

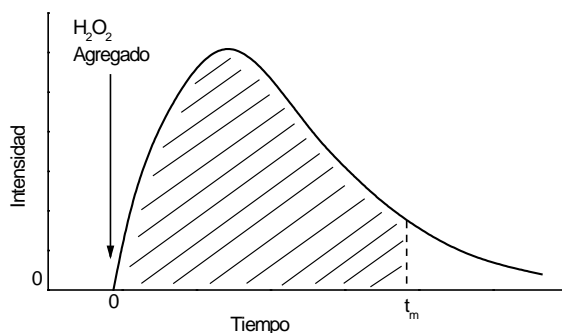
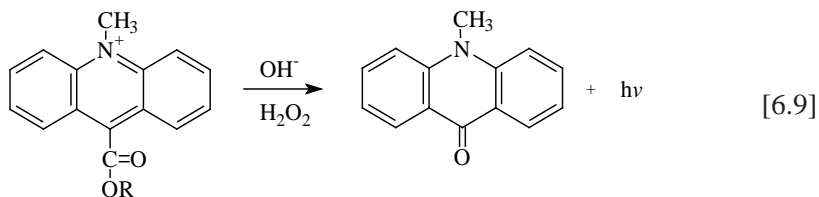


Figura 6.7. Intensidad de luz a 430 nm en función del tiempo, para un ensayo de tipo emparedado Ab:Ag:Ab-Luminol. La integración ocurre entre el tiempo de adición de H_2O_2 y t_m .

La reacción del luminol no es particularmente eficaz como sistema de marcado, puesto que el rendimiento cuántico de la fluorescencia del luminol es mucho más bajo si el luminol está químicamente unido a otra especie.

Un sistema de marcado quimioluminiscente recientemente introducido emplea ésteres de arilacridina (arylacridinium esters)¹⁷ como marcadores que pueden unirse fácilmente a los residuos de tirosina de las proteínas. En presencia de hidróxido y de H_2O_2 , el éster es cortado oxidativamente, rindiendo 10-metilacridina (10-methylacridone) más emisión de luz (Eq. 6.9). Esta reacción no requiere un catalizador enzimático, y el rendimiento cuántico es elevado inclusive cuando este marcador se encuentra unido a proteínas, dado que el apagamiento (quenching) producido por la cercanía a una proteína o hapteno es reducida al mínimo por la liberación de la acridina excitada. Casi toda la luz se emite dentro de los 10 s posteriores a la oxidación, y por ello altos valores de S/N son alcanzables. Además, los anticuerpos pueden ser marcados hasta tal punto que actividades específicas de 10^{15} fotones se obtienen por cada gramo de anticuerpo marcado. Sin embargo, el enlace de éster fenilo es intrínsecamente inestable a la hidrólisis, de modo que los reactivos marcados tienen una vida útil limitada. Investigación hacia ésteres de acrilina más estables está siendo realizada.

17. D. Hawcroft, T. Hector y F. Rowell, "Quantitative Bioassay", Wiley, New York, 1984, pp. 183-185.



Los marcadores quimioluminiscentes pueden también ser utilizados en análisis con antígenos marcados (competitivos). El antígeno (analito) compete con el analito marcado para unirse al anticuerpo inmovilizado, y después de un paso de lavado, se agregan los reactivos necesarios para generar quimioluminiscencia por los compuestos marcadores.

Inmunoensayos tipo “kits” usando como marcadores éster de luminol y arilacridina han sido desarrollados por nueve compañías para una variedad de hormonas tiroideas, pituitarias, hormonas esteroides, virus, digoxina y creatinina quinasa. Un análisis para la tirosina total y libre tiene un límite de detección de cerca de 20 pM en suero, mientras que otro para la triiodotironina total y libre tiene un límite de detección de 3 pM en suero. Estos analitos se utilizan como indicadores clínicos de malfuncionamiento de la glándula tiroides. Mientras que la investigación ha demostrado que los límites de detección de los métodos que usan marcadores quimioluminiscentes deberían igualar los obtenidos usando marcadores enzimáticos o radiactivos, las aplicaciones prácticas han demostrado una limitada precisión como resultado de la cinética de la emisión. Las reacciones de luminiscencia proceden tan rápidamente (500.000 fotones/s) que la reproducibilidad al capturar una fracción constante de fotones requiere un fotomultiplicador que posea una precisión excelente sobre un rango dinámico de muchos órdenes de magnitud. Los ensayos usando un conjugado de tirosina-isoluminol produjeron coeficientes de variación (integrando la respuesta) de entre el 13% al 18%, calculado sobre un total de 15 mediciones realizadas sobre una misma muestra.

6.3.6 Marcas enzimáticas

Las enzimas son actualmente los marcadores más extensamente utilizados e investigados en inmunoensayos. Esto es porque una única molécula enzimática utilizada como marcadora puede proporcionar múltiples copias de especies perceptibles, y esta *amplificación catalítica* da lugar a muy buenos límites de detección en los inmunoensayos, que rivalizan con los obtenidos en radioinmunoanálisis, sin los problemas del almacenaje y de la disposición asociados a los radioisótopos. En los inmunoensayos enzimáticos, pueden ser marcados tanto el ligando como el anticuerpo, y la actividad enzimática en la fracción ligada o libre se mide. Los inmunoensayos heterogéneos que emplean marcadores enzimáticos han sido denominados ELISAs (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays). Los métodos de ELISA emplean generalmente el anticuerpo inmovilizado sobre los pozos de las placas multipozo de poliestireno, y pueden ser competitivos o no competitivos. En un ELISA competitivo,

VI. INMUNOENSAYOS CUANTITATIVOS UTILIZANDO MARCADORES (LABELS)

el antígeno marcado enzimáticamente compite con el antígeno libre (el analito) para una cantidad fija y escasa de sitios de unión del anticuerpo inmovilizado, según lo ilustrado en la Figura 6.8. Después de la incubación, el soporte es lavado para quitar las especies no unidas, y el sustrato de la enzima se agrega en concentración saturante. La conversión del sustrato en producto se puede medir continuamente, en un análisis cinético, en el cual la velocidad de conversión disminuye con el aumento de la concentración de antígeno en la muestra. Más a menudo, se utiliza la medición a un tiempo fijo; después de un dado tiempo de incubación, la reacción es detenida por la adición de un ácido o de una base fuerte que desnatura la enzima. La cuantificación del producto entonces puede ser utilizada para construir una curva de calibración, en la que la concentración del producto disminuye con el aumento de la concentración del antígeno libre.

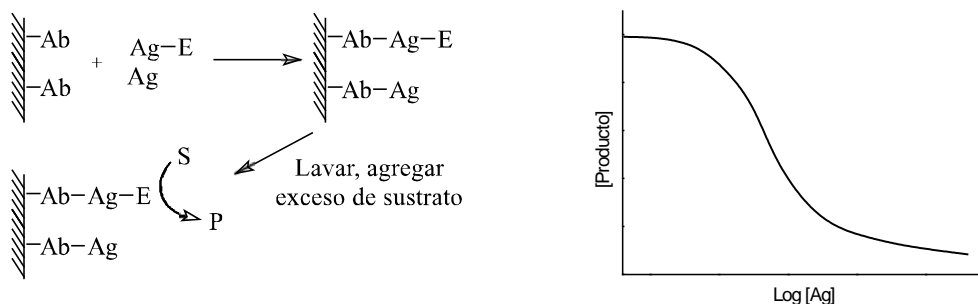


Figura 6.8. ELISA competitivo.

Los métodos ELISA no competitivos se basan en análisis tipo sándwich, como se observa en la Figura 6.9. Un anticuerpo primario inmovilizado está presente en exceso, y se une cuantitativamente al antígeno. Un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente entonces se agrega al medio de reacción, de tal manera que pueda unirse con el antígeno inmovilizado, formando un sándwich que es detectado midiendo la actividad enzimática unida al soporte sólido. ELISAs no competitivos producen curvas de calibración en las cuales la actividad enzimática aumenta con el aumento de la concentración de antígeno libre.

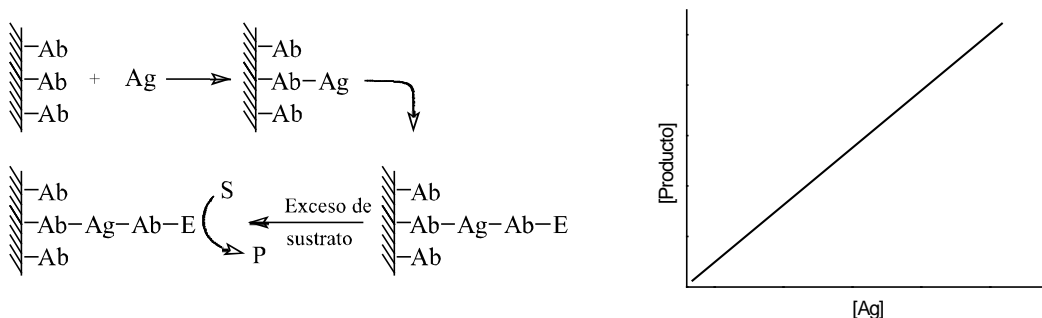
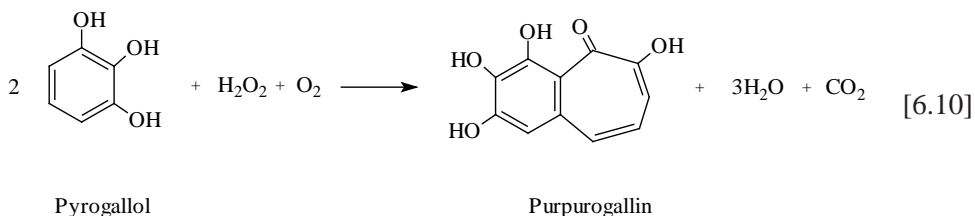


Figura 6.9. ELISA no competitivo.

Ambos métodos ELISA, competitivos y no competitivos, emplean la tecnología de placas multipozo, para permitir la automatización de los ensayos. La robótica se utiliza para la adición de reactivos y el control de los tiempos de incubación, mientras que los lectores automatizados de placas permiten la medida de los valores de absorbancia en cada uno de los pozos. Un ELISA típico utiliza algunas filas de la placa para las diluciones seriales y las réplicas de una solución estándar del antígeno, mientras que otros se utilizan para las diluciones seriales y las réplicas de las muestras incógnitas. Varias diluciones de las muestras incógnitas se emplean para asegurarse de que por lo menos un valor de la dilución producirá resultados que permitan la interpolación en la curva de calibración. Además, la mayor sensibilidad de un ELISA competitivo se obtiene cuando iguales concentraciones del antígeno libre y el marcado enzimáticamente compiten por el anticuerpo inmovilizado. Con ELISAs no competitivos, la concentración del antígeno debe ser suficientemente baja, de tal manera de que todo el antígeno (100%) pueda unirse al anticuerpo.

Una enzima ideal para ser utilizada como marca deber tener una elevada velocidad enzimática (k_{cat}) un producto que pueda medirse fácilmente, y un sustrato que no interfiera con la medida. Además, debe ser barata, estable y resistente a interferencias que puedan estar presentes en muestras biológicas. La enzima, su sustrato y su producto no deben normalmente estar presentes en las muestras para el análisis.

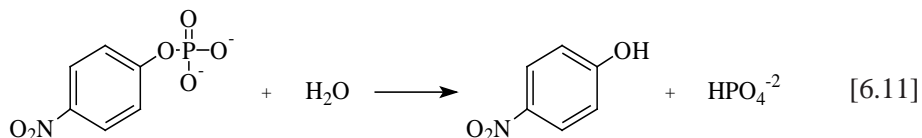
Cinco enzimas se emplean comúnmente como enzimas de marcado en inmunoensayos.¹⁸ La más extensamente utilizada es la peroxidasa de rábano picante (E.C.1.11.1.7), debido a su alta actividad específica (4500 U/mg a 37 °C) y porque esta enzima de 40 kD es relativamente no específica para su sustrato secundario. Esto significa que una variedad de colorantes reducidos pueden ser utilizados como sustratos, los que se convertirán por la acción enzimática en sus formas oxidadas, altamente absorbentes. Pirogalol (pyrogallol) es utilizado a menudo como sustrato para esta reacción (Eq. 6.10):



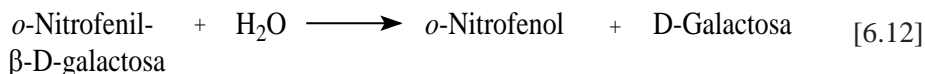
La fosfatasa alcalina (E.C.3.1.3.1) también se utiliza en muchos inmunoensayos con amplificación enzimática. Esta enzima cataliza la hidrólisis de monoesteres ortofosfóricos, para producir alcohol y ortofosfato. Su peso molecular es de unos 100 kD, tiene un pH óptimo cercano a 9, y exhibe actividades de 1000 U/mg (37 °C). Utilizando como sustrato el p-nitrofenilfosfato, el p-nitrofenol producido puede ser medido a 450 nm (Eq. 6.11):

18. A. Johannsson en “*Principles and Practice of Immunoassay*”, C. Price y D. Newman, Eds., Macmillan, New York, 1991. pp. 300-303.

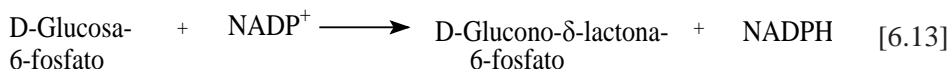
VI. INMUNOENSAYOS CUANTITATIVOS UTILIZANDO MARCADORES (LABELS)



La β -Galactosidasa (E.C.3.2.1.23) cataliza la hidrólisis de los residuos no reductores terminales de la β -D-galactosa en β -D-galactosidos. Esta enzima tiene un peso molecular de 540 kD, un pH óptimo alrededor de 7,0 y una actividad específica (37 °C) de 600 U/mg. Un sustrato sintético, el *o*-nitrofenil- β -D-galactosido, es hidrolizado por esta enzima en *o*-nitrofenol, el que puede ser medido fácilmente (Eq. 6.12):



La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.49) es también utilizada comúnmente como marca. Esta enzima tiene un peso molecular de 104 kD, y las preparaciones puras muestran una actividad óptima a pH 7,8, con una actividad específica de 400 U/mg a 37 °C. La deshidrogenasa cataliza la oxidación de D-glucosa-6-fosfato con la reducción concomitante de NADP⁺ (Eq. 6.13). La absorbancia o la fluorescencia del NADPH que se produce en esta reacción se puede utilizar para la cuantificación.



La ureasa (E.C.3.5.1.5) cataliza la descomposición hidrolítica de la urea en los iones amonio, bicarbonato e hidróxido. Tiene un peso molecular de 483 kD, y preparaciones con actividades específicas de 10.000 U/mg a 37 °C y pH 7,0 están comercialmente disponibles.

Los inmunoensayos heterogéneos se pueden utilizar con los sistemas convencionales que utilizan placas multipozo en laboratorios clínicos, pero también se han adaptado para ser utilizados en el consultorio médico y en los dispositivos hogareños de diagnóstico. Por ejemplo, un dispositivo para detectar los anticuerpos contra el virus humano de la inmunodeficiencia (HIV), funciona según el principio mostrado en la Figura 6.10.¹⁹

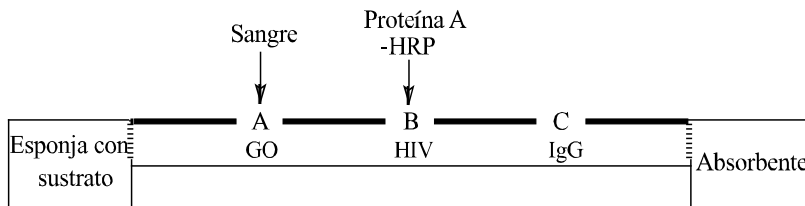


Figura 6.10. Aparato para realizar un inmunoensayo para detectar anticuerpos para HIV.¹⁹

19. R.M. Nakamura, Y. Kasahara y G.A. Rechnitz, Eds., "Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s", American Society for Microbiology, Washington DC, 1992.

Preparaciones de glucosa oxidasa (GO), de antígeno recombinante del HIV, e IgG humana, todos ellos inmovilizados sobre partículas (granos) de látex (diámetro de 0,9 mm), se incluyen en fieltro de fibra de vidrio absorbente (donde el líquido puede ser arrastrado por capilaridad), en posiciones sucesivas a lo largo del fieltro (A, B, y C, respectivamente). Una muestra de sangre entera se agrega en la posición A, y se separa e interactúa con los granos de antígeno de HIV inmovilizado sobre las partículas de látex. Una solución de sustrato para la glucosa oxidasa y la peroxidasa entonces se permite fluir a lo largo del extremo de muestreo del fieltro, y un conjugado de peroxidasa de rabano picante y la proteína A se agrega en la posición B. La proteína A se une a las inmunoglobulinas en una región alejada de la posición de unión con el antígeno. El flujo de la solución de sustratos resulta en la liberación de peróxido de hidrógeno en la posición A, donde la glucosa oxidasa es inmovilizada. Este es arrastrado por la solución de sustratos hasta la posición B, donde reacciona con el conjugado de proteína A y peroxidasa, el que fue capturado por los anticuerpos anti-HIV unidos a los granos de HIV-látex. Un colorante reducido, presente en la solución de sustratos se convierte a un producto coloreado insoluble, que forma un depósito coloreado en el sitio B. El conjugado proteína A-peroxidasa que no ha reaccionado fluye “corriente abajo” hasta el sitio C, donde es capturado por los granos de anti-IgG-látex. Entonces, el mismo depósito coloreado insoluble se forma también en el sitio C. El flujo de la solución de sustratos a lo largo del fieltro es mantenido colocando una esponja, o un fieltro absorbente, en el extremo lejano. Los resultados se obtienen en menos de 15 minutos, en los que la obtención de color en los sitios B y C representan un resultado positivo para anti-HIV, mientras que la presencia de color solamente en el sitio C es un resultado negativo. El límite de detección de este dispositivo es similar a un método convencional de ELISA para anti-HIV, pero este ha sido diseñado para ser utilizado como un sistema cualitativo y descartable.

6.4 Inmunoensayos homogéneos

Los inmunoensayos homogéneos han tenido un desarrollo más tardío que los ensayos heterogéneos. Se basan en el marcado del antígeno, provocando reacciones que producen grandes cambios de la señal luego de la unión al anticuerpo, de modo que la separación de las fracciones ligadas y libres del marcador es innecesaria. Los fluoróforos y las enzimas representan a mayoría de los marcadores usados en inmunoensayos homogéneos²⁰, y ejemplos representativos de éstos son proporcionados a continuación.

20. C. Price y D. Newman en “*Principles and Practice of Immunoassay*”, C. Price y D. Newman, Eds., Macmillan, New York, 1991. pp. 393-416.

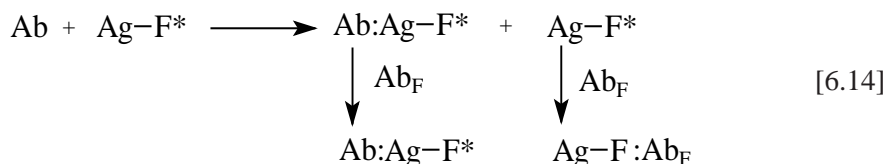
6.4.1 Marcas fluorescentes

Estimulación de Intensidad de Fluorescencia (enhancement fluorescence). En este método, el antígeno o el ligando es marcado con un fluoróforo. La intensidad de la fluorescencia aumenta luego de la unión al anticuerpo, debido a las modificaciones en las condiciones en las que se encuentra el fluoróforo (hidrofílico a hidrofóbico, por ejemplo) o debido a la transferencia de energía de fluoróforos tales como los residuos de triptofano y tirosina en el anticuerpo. Un aumento en la concentración del antígeno sin marcar da lugar a una disminución de la unión del antígeno marcado, y por lo tanto a una disminución de la intensidad de la fluorescencia. Un inmunoensayo para la detección de tiroxina (T_4) que aplica estos principios ha sido publicado; este emplea T_4 marcado con fluoresceína como el conjugado hapteno-marcador. El mecanismo para la estimulación de la fluorescencia luego de la unión al anticuerpo no es del todo conocido, pero se piensa que involucra el apagamiento intramolecular (quenching) de la fluorescencia de la fluoresceína por los átomos de yodo en la T_4 ; el apagamiento disminuye luego de que se une el anticuerpo, cuando el epítopo de la tetra-yodo tironina interactúa con el paratope del anticuerpo, de tal manera de que en ausencia de T_4 libre (el analito), se observara un máximo de intensidad de fluorescencia. La adición de T_4 da lugar a una reducción de la intensidad de fluorescencia. Este análisis homogéneo muestra un aumento cuadruple de la intensidad de fluorescencia de 4 veces luego de la unión de un 100% de antígeno marcado. Aplicaciones prácticas de este método son raramente encontradas en la literatura, debido a que los efectos de la estimulación son generalmente muy pequeños como para ser útiles analíticamente.

Apagamiento Directo de Fluorescencia (Direct Quenching Fluorescence). Este método se realiza en fase homogénea, y emplea como señal analítica la disminución de la intensidad de fluorescencia que ocurre luego de la unión del ligando marcado con un fluoróforo y el anticuerpo. La fluorescencia disminuida de la marca ocurre como resultado de la unión con el anticuerpo, el que “apaga” la emisión de fluorescencia. Cuando la concentración del antígeno (analito) es alta, menos del antígeno marcado podrá unirse al anticuerpo, de modo que la intensidad de la fluorescencia aumenta. El cambio de la señal de fluorescencia es generalmente pequeño con este método, especialmente cuando el antígeno es grande y enmascara parcialmente la emisión de la marca fluorescente. Sin embargo, un análisis útil para la gentamicina se ha desarrollado usando este principio. La fluorescencia de la gentamicina marcada con fluoresceína disminuye cerca del 40% cuando está unida a anti-gentamicina; este apagamiento es inhibido en presencia de gentamicina libre, de modo que la intensidad de la fluorescencia aumenta con la concentración del analito.

Apagamiento Indirecto de Fluorescencia (Indirect Quenching Fluorescence). Con este método, un segundo anticuerpo es generado, dirigido hacia el marcador fluorescente en sí mismo. Luego de la incubación del antígeno marcado y sin marca con el anticuerpo primario, el anticuerpo hacia la marca fluorescente es agregado. Debido a obstáculos estéricos, este

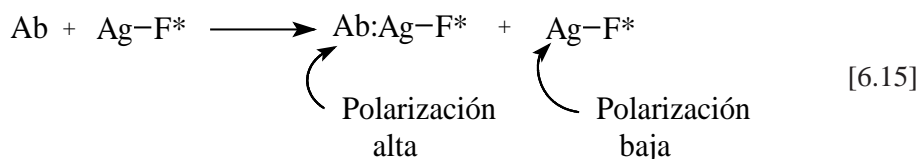
segundo anticuerpo se unirá solamente al marcador fluorescente si el antígeno marcado está libre, es decir, no ligado al anticuerpo primario. Luego de la unión del segundo anticuerpo, la fluorescencia del marcador se apaga. El incremento de la concentración de antígeno libre da lugar a mayores concentraciones de antígeno marcado libre, y por ello una menor intensidad de la fluorescencia (Eq. 6.14):



Este principio se ha aplicado a los análisis para T_4 , la hormona lactógeno placentaria humana, y la albúmina de suero humano. El análisis de T_4 implica la utilización de T_4 marcado con fluoresceína, formando un complejo con un anticuerpo anti-fluoresceína de baja-afinidad. Cuando se agrega anti- T_4 , este desplaza el T_4 marcado con fluoresceína, liberándolo del anticuerpo anti-fluoresceína. Esto da lugar a un aumento en intensidad de la fluorescencia. En la presencia de T_4 libre, menos del T_4 marcado está unido al anticuerpo anti- T_4 , de modo que más complejo anti-fluoresceína-fluoresceína- T_4 esté presente, y se reduce la intensidad de la fluorescencia. Una ventaja importante de este método sobre otros inmunoensayos homogéneos es que un antígeno relativamente impuro se puede utilizar para la reacción de marcado. En principio, las impurezas marcadas con el fluoróforo en el reactivo (antígeno marcado) serán “apagadas” por los anticuerpos anti-fluoróforo, por lo que no deberían contribuir a la fluorescencia de fondo.

Inmunoensayo de Polarización de Fluorescencia (Fluorescence Polarization Immunoassay). Se utiliza radiación polarizada para excitar fluoróforos, los que emiten radiación fluorescente polarizada, debido a la relación entre la orientación molecular y la absorción y emisión de la radiación. Primeramente publicado en 1973,²¹ los inmunoensayos de polarización de fluorescencia (FPIA) se basan en las diferencias en la velocidad de la rotación con el peso molecular. Idealmente, un antígeno pequeño o hapteno marcado con un fluoróforo rotará muy rápidamente en la solución, y exhibirá un máximo de intensidad de emisión perpendicular al plano de la luz polarizada incidente. Luego de su unión a una molécula de anticuerpo de gran tamaño, la rotación lenta produce una disminución perceptible en la emisión perpendicular (Eq. 6.15). Los análisis homogéneos competitivos por lo tanto rinden intensidades de emisión perpendicular crecientes, cuando se incrementa la concentración de antígeno libre, puesto que más conjugado fluoróforo-antígeno existe libremente en la solución. Este principio se ha aplicado con éxito a una variedad de inmunoensayos comercializados por Abbott Laboratories.

21. W.B. Dandliker, R.J. Kelly y J. Dandliker, J. Farquhar and J. Levin, *Immunochemistry* **10**, 1973, 219-227.



Un análisis de fenobarbitona, por ejemplo, con un marcador de fluoresceína, tiene un antígeno marcado libre con un peso molecular de cerca de 500, que aumenta a más de 150 kD luego de la unión al anticuerpo. Un análisis competitivo similar para la digoxina tiene un límite de detección de 0,2 µg/mL.

Transferencia de Excitación de Fluorescencia (Fluorescence Excitation Transfer). Similar al análisis heterogéneo descrito anteriormente, el inmunoensayo de transferencia de excitación emplea dos fluoróforos, F1 y F2. Cuando ambos se encuentran a muy corta distancia, el F2 apaga la emisión de F1, pero cuando el F2 y el F2 están separados, esencialmente no ocurre ningún fenómeno de apagado. En los ejemplos han sido publicados, F1 es fluoresceína isotiocianato, que cuando esta unida mediante un enlace de tipo tiourea a un antígeno o anticuerpo absorbe a 490 nm y emite a 525 nm. El F2 es tetraetilrodamina, que exhibe un máximo de absorbancia a 525 nm. Un análisis directo para la morfina utiliza anti-morfina marcada con rodamina y morfina marcada con fluoresceína. Un “apagamiento” máximo del 72% (o una intensidad mínima de fluorescencia del 28%) fue observado para el conjugado rodamina-antimorfina-morfina-fluoresceína, cuando se compara con la fluoresceína-morfina libre en la solución. El complejo que combina F1 y F2, el fluoróforo y el “apagador” se encuentran a una distancia de entre 5 –10 nm, facilitando la transferencia de energía por acoplamiento dipolo-dipolo. La morfina sin marcador compete con la morfina marcada con fluoresceína para los sitios de unión al anticuerpo, obteniéndose una intensidad creciente de fluorescencia (o menor apagamiento).

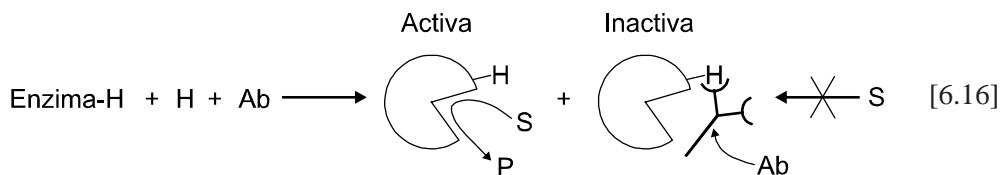
6.4.2 Marcadores enzimáticos

Ambos métodos, competitivos y no competitivos, han sido incorporados en inmunoensayos homogéneos comerciales, en formato tipo “kit”, en los que se utiliza marcadores enzimáticos; en estos ensayos, en última instancia, se relaciona la actividad enzimática medida con la concentración del analito.²² Los análisis competitivos se denominan habitualmente técnica de inmunoensayo con amplificación enzimática (enzyme-multiplied immunoassay technique, EMIT), inmunoensayo con sustrato marcado con fluoresceína (substrate-labelled

22. P. Khanna en “*Principles and Practice of Immunoassay*”, C. Price y D. Newman, Eds., Macmillan, New York, 1991. p.327.

fluorescein immunoassay, SLFIA), inmunoensayo de reactivación de apoenzima (apoenzyme reactivation immunoassay, ARIS), e inmunoensayo de enzima donante clonada (cloned enzyme donor immunoassay, CEDIA), mientras que un método no competitivo ha sido llamado inmunoensayo homogéneo de inhibición enzimática (enzyme inhibitory homogeneous immunoassay, EIHA).

Técnica de inmunoensayo con amplificación enzimática. EMIT es un método homogéneo para la cuantificación de haptenos, especialmente hormonas, drogas terapéuticas y drogas de abuso. EMIT es un análisis competitivo, en el cual el hapteno presente en la muestra y el hapteno marcado enzimáticamente compiten para unirse a una cantidad fija y escasa de anticuerpo (Eq. 6.16).

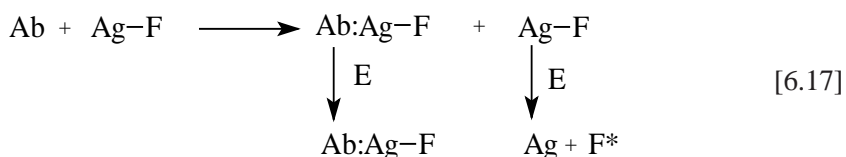


Los haptenos libres marcados enzimáticamente presentan una alta actividad enzimática, pero si el anticuerpo está unido al hapteno, la actividad enzimática es drásticamente reducida, debido al obstáculo estérico o a los cambios estructurales en el sitio activo de la enzima que resultan de la unión al anticuerpo. La actividad enzimática por lo tanto aumenta con el aumento de la concentración libre de antígeno. En estos ensayos, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o lisozima son utilizadas como enzimas marcadoras. Límites de detección de cerca de 1 ng/mL son típicos.

Un segundo tipo de EMIT ha sido desarrollado utilizando la enzima malato deshidrogenasa como marcador enzimático. Experimentalmente se ha demostrado que la tiroxina inhibe competitivamente la malato deshidrogenasa. Se preparó un conjugado utilizando tiroxina unida covalentemente en un sitio cercano al sitio activo de la enzima; en este conjugado la enzima presenta una actividad específica muy baja, que puede ser restaurada por la unión de la tiroxina a un anticuerpo anti-tiroxina. En este análisis muy específico para la tiroxina, se produce el aumento de la actividad enzimática por la unión del anticuerpo, de modo que en un análisis competitivo para la tiroxina libre, la actividad enzimática disminuirá con el aumento de la concentración de tiroxina libre en las muestras.

Inmunoensayo con Sustrato Marcado con Fluoresceína. Este análisis, también llamado inmunoensayo de liberación enzimática de fluorescencia, emplea un antígeno marcado con un fluoróforo, cuya fluorescencia está siendo apagada por el antígeno o bien no existente como resultado de la conjugación. Después de la incubación con el anticuerpo, la mezcla que resulta se incuba con una enzima hidrolítica que rompe únicamente la unión con el marcador fluorescente si el antígeno marcado está libre. La ruptura no ocurre cuando el anticuerpo está unido al antígeno marcado, porque la presencia del anticuerpo previene el acceso al sitio activo de la enzima. Concentraciones crecientes del antígeno en las muestras

producen mayores concentraciones de antígeno marcado libre, y por lo tanto una creciente intensidad de la fluorescencia (Eq. 6.17). Este método se ha adaptado en varios análisis comerciales en formato “kit”, incluyendo más de diez drogas terapéuticas tales como el compuesto antiasmático teofilina (theophylline) así como los antibióticos gentamicina y tobramicina (tobramycin). En el análisis para gentamicina, β -galactosil umbeliferona (β -galactosylumbelliferone) unida a gentamicina se utiliza como el antígeno marcado, que no es fluorescente. La β -galactosil umbeliferona libre reacciona con β -galactosidasa para formar un producto que emite a 453 nm después de ser excitado a 400 nm. Cuando el antígeno marcado está unido al anticuerpo anti-gentamicina, motivos estéricos previenen la ruptura enzimática del conjugado para obtener el producto fluorescente. Este análisis puede detectar fácilmente niveles del gentamicina de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en suero, usando volúmenes de suero de 1 μL .

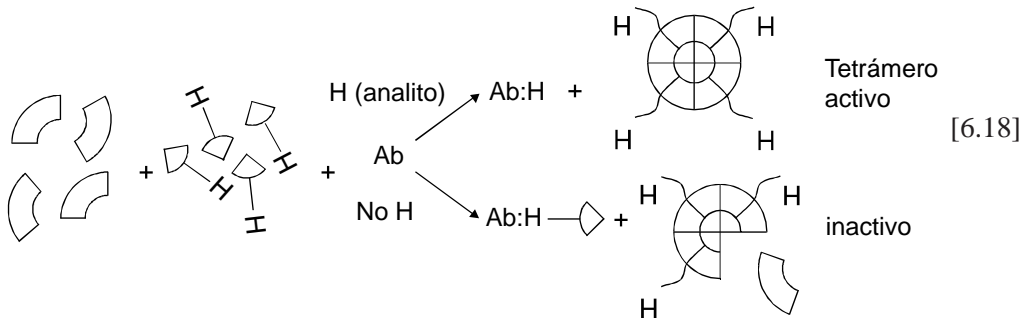


Inmunoensayo de Reactivación de Apoenzima. Los análisis ARIS emplean un grupo prostético, flavina adenina dinucleotido (FAD), como marcador del antígeno en un inmunoensayo competitivo en solución y en los nuevos formatos en film y en tiras de papel, denominados de inmunoquímica seca. En la solución, la competición entre el antígeno libre y el marcado con FAD para los sitios de unión del anticuerpo produce una mezcla de la especie libre y ligada del FAD. Las especies libres se pueden combinar con la apoenzima de la glucosa oxidasa para formar una holoenzima activa, mientras que las conjugaciones antígeno-FAD ligadas al anticuerpo están imposibilitadas estéricamente para combinarse con la apoenzima. Por ello, la actividad enzimática aumenta cuando la concentración del antígeno libre aumenta. Un kit comercial utilizando la metodología ARIS para la teofilina tiene un límite de detección de 5 ng/mL.

Inmunoensayo de Enzima Donante Clonada. Esta técnica, abreviadamente CEDIA, se ha desarrollado como resultado de la tecnología del DNA recombinante, y de una comprensión profunda de la enzima β -galactosidasa. Esta enzima es activa solamente en su estructura nativa tetramérica; las cuatro subunidades idénticas que componen el tetrámero son inactivas, solo cuando se ensamblan, dando lugar a la holoenzima con su estructura cuaternaria, presenta actividad catalítica. Ahora se sabe que si cualquiera de los aminoácidos entre las posiciones 10 y 60 del extremo N-terminal de una subunidad de la β -galactosidasa están ausentes, una holoenzima tetramérica activa no puede ser formada.

Dado esta información, los investigadores han ideado los componentes del “donante” y del “aceptor” de la subunidad de β -galactosidasa. El donador de la enzima se conjuga con el antígeno, y por ello se transforma en un marcador indirecto para el inmunoensayo, de tipo

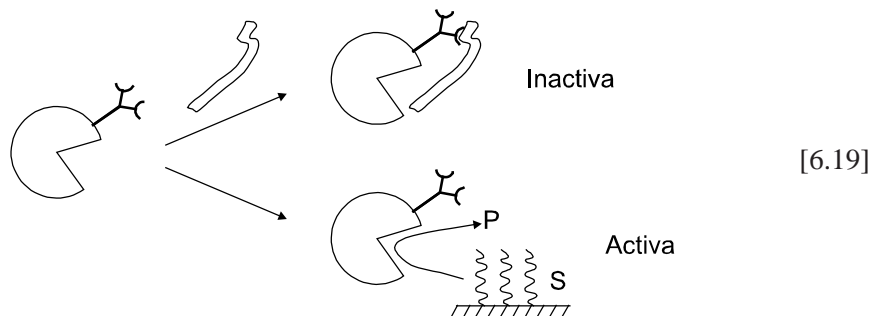
competitivo. Si este antígeno marcado no está ligado al anticuerpo, entonces la combinación del donante y el aceptor dan lugar a una subunidad completa, que puede combinarse con otras tres subunidades completas para formar un tetramero activo. Si el antígeno marcado esta unido al anticuerpo, los efectos estéricos previenen la combinación entre el donante y el aceptor, de modo que la generación de la enzima activa no es posible a partir de ese polipéptido, una subunidad potencial. Los conceptos utilizados en esta metodología se pueden observar en la Eq. 6.18:



Los análisis tipo CEDIA muestran una actividad creciente de β -galactosidasa con el aumento de la concentración del antígeno. Los análisis comerciales de CEDIA para la digoxina y otros antígenos han alcanzado límites de detección del orden de los nanogramos por mililitro de suero, y por ello son competitivos con otros métodos en los que se realiza el marcado con enzimas.

Inmunoensayo Homogéneo de Inhibición Enzimática. Este es un inmunoensayo no competitivo, homogéneo, que utiliza un anticuerpo marcado enzimáticamente, donde el sustrato de la enzima es una especie insoluble. Este tipo de análisis se ha encontrado mas adecuado para analizar antígenos macromoleculares, tales como la α -fetoproteína (altos niveles de esta proteína son indicativos de embarazos anormales) y ferritina, una proteína transportadora de hierro. Las enzimas empleadas en los análisis comerciales son la α -amilasa y la dextranasa, que hidrolizan sustratos de alto peso molecular en sus componentes constituyentes, de bajo peso molecular.

El EIHA se basa en la inhabilidad de la enzima para tener acceso al sustrato en la presencia de un exceso de antígeno, según se muestra en la Eq. 6.19:



En efecto, cuando se unen antígeno y anticuerpo, se bloquea el acceso al sitio activo de la enzima, y no permite su acercamiento al sustrato insoluble. Cuanto más alto es el peso molecular del antígeno, mayor es el efecto inhibitorio sobre actividad enzimática en el complejo enzima-anticuerpo-antígeno. Los kits comerciales para el análisis de α -fetoproteína y la ferritina tienen límites de detección de 1 ng/mL y de 5 ng/mL, respectivamente, y muestran muy buena correlación con métodos convencionales inmunológicos, como RIA y ELISA.

6.5 Evaluación de nuevos inmunoensayos^{23,24}

Esta sección destaca algunos aspectos de la validación especialmente importantes para los métodos inmunológicos. Se asume un cierto conocimiento en el análisis de datos; los métodos usados generalmente para la evaluación y la validación de nuevos análisis se describen más adelante en este libro (Capítulo 16) y se pueden consultar para clarificar algunos de los conceptos usados en esta sección.

La matriz de la muestra desempeña un papel más importante en los inmunoensayos que en la mayoría de los otros tipos de análisis. Por matriz entendemos todo componente de la muestra que no es la especie del interés. En los inmunoensayos, la matriz tiene muchos más componentes que un típico blanco de reactivos utilizado en espectrofotometría. Las reacciones inmunológicas son a menudo muy sensibles a la presencia de proteínas, a la fuerza iónica, y a la presencia de lípidos y de enzimas. Los componentes de la matriz pueden interactuar con el analito, evitando que este se adsorba al vidrio o al plástico, de tal modo que se puede inclusive aumentar la recuperación. La concentración de la proteína es el mayor contribuidor al efecto de la matriz. Por esta razón, la mayoría de los inmunoensayos en formato kit proporcionan estándares preparados en suero humano o animal. Los sueros animales son utilizados a menudo para preparar estándares de cero, también pueden utilizarse para realizar una curva de calibración. Los niveles de distintas drogas terapéuticas se miden a menudo en muestras que no son de suero, tales como fluido cerebro espinal, orina o ultrafiltrados; para cada uno de estos fluidos se requieren diferentes estándares, debido a que el diferente efecto de cada matriz sobre el análisis produciría considerables errores si se utilizan las curvas de calibración realizadas con suero. La medición de series de muestras control (denominadas generalmente controles negativos) se deben realizar para determinar la unión no

23. R.M. Nakamura, Y. Kasahara y G.A. Rechnitz, Eds., *Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s*, American Society for Microbiology, Washington DC, 1992.

24. R. Ekins en *Principles and Practice of Immunoassay*, C. Price y D. Newman, Eds., Macmillan, New York, 1991. pp. 96-153.

específica de los reactivos del análisis; estos controles incluyen todos los componentes del análisis excepto el anticuerpo, el que es substituido por una proteína inerte, de tal manera de mantener exactamente la misma matriz.

Durante la evaluación de los métodos, las curvas estándares se deben trazar de varias maneras, puesto que diversos diagramas revelan diversas características de la reacción. Por ejemplo, cuando se grafica ligado/libre versus la concentración, el gráfico tiene una pendiente elevada a bajas concentraciones, y puede ser utilizado para calcular el límite de detección del análisis. Los diagramas sigmoideos de ligado/total versus la concentración muestran regiones de insensibilidad (en los extremos bajos y altos de concentración) que pueden ser poco evidentes en la curva logit-log.

Los bajos límites de detección que pueden alcanzarse con inmunoensayos dependen de las afinidades, típicamente altas, de los anticuerpos para los haptenos y antígenos, así como de los límites de detección de las moléculas marcadoras usadas. El límite de detección se define generalmente como la concentración que produce una señal que sea igual al valor medio de la señal del blanco más dos o tres desviaciones estándar. Esto establece los límites de confianza para la respuesta igual a cero. Para este cálculo, el diagrama de ligado/libre versus la concentración es utilizado. Mientras que los límites de detección permiten la comparación de diversos inmunoensayos respecto a la mínima concentración detectable, no dicen nada acerca de la confiabilidad del análisis; por esta razón, los límites de detección y los perfiles de precisión deben ser comparados.

La exactitud puede definirse como la capacidad fundamental de cualquier análisis de medir la concentración verdadera de un analito. La utilización de estándares puros en una matriz válida son a menudo difíciles de obtener, y la reactividad biológica de estándares menos puros puede no equiparar la inmunoreactividad del analito en el análisis. Por otra parte, los estándares pueden ser puros, pero el anticuerpo analizado puede reaccionar con moléculas similares o fragmentos; esta reactividad cruzada se discutirá detalladamente mas abajo. La exactitud se debe confirmar por la comparación con uno o varios métodos previamente validados usando muestras reales.

La *reactividad cruzada* (cross-reactivity, un indicador de la especificidad del análisis) tiene importancia crítica para los inmunoensayos, en los cuales un analito particular se ensaya en la presencia de especies muy similares; por ejemplo, en el monitoreo de una droga terapéutica en suero donde están también presentes varios de los metabolitos de la droga. Con el objeto de uniformar la manera de informar este parámetro, la reactividad cruzada se informa generalmente como la masa o la concentración de interferente requerida para desplazar el 50% de la marca, según lo muestra en la Figura 6.11.

$$\%C = 100 \times \frac{[S]_{50}}{[C]_{50}} \quad [6.20]$$

VI. INMUNOENSAYOS CUANTITATIVOS UTILIZANDO MARCADORES (LABELS)

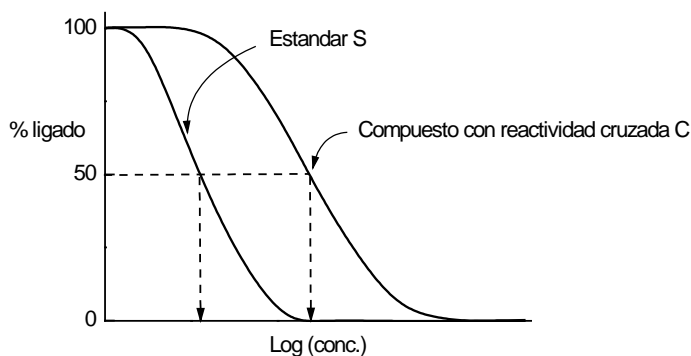


Figura 6.11. Actividad cruzada (cross-reactivity) de un interferente en un inmunoensayo competitivo.

La reactividad cruzada es evaluada comparando la capacidad de cada material o especie que potencialmente puede desplazar al marcador. El porcentaje de reactividad cruzada es igual a 100 veces la concentración del analito cuando la respuesta es del 50% dividido por la concentración de interferente cuando la respuesta es del 50%, como se observa en la Eq. 6.20.

La reactividad cruzada depende de la selectividad de un anticuerpo para un epítopo particular, y se puede controlar en cierto grado por el diseño cuidadoso del agente inmunogénico utilizado para producir los anticuerpos. El sitio y la naturaleza de la unión del hapteno a la proteína portadora (carrier protein) es crítica para la selectividad del inmunoensayo. Además, la conjugación del hapteno con el portador se debe preparar de la misma manera que el hapteno etiquetado que será utilizado en el análisis, de modo que epítopes similares estén disponibles para unirse al anticuerpo. Los anticuerpos producidos contra un hapteno conjugado a una proteína portadora a través de un grupo separador (linking group) a menudo reconocen también el grupo separador; por ejemplo, el hapteno 2,4-dinitrofenol puede ser ligado a una proteína portadora por la reacción con el 2,4-dinitrofluorobenceno (reactivo de Sanger) a los grupos amino primarios de los residuos del lisina, produciéndose un anticuerpo que se une preferencialmente al 2,4-dinitrofenil lisina sobre el 2,4-dinitrofenol.²⁵

Heterología es el término usado para describir el uso de diferentes derivados de haptenos para la preparación del agente inmunológico y la preparación del hapteno marcado. Hay tres tipos de heterología que se reconocen como importantes para ensayar la selectividad.²⁶ Heterología del hapteno ocurre cuando diversos haptenos se utilizan para producir el agente inmunológico y la especie marcada; por ejemplo, un análisis para detectar estradiol que produce el agente inmunológico ligando el estradiol a la proteína portadora a través del grupo 11-hidroxí, mientras que la especie marcada enzimáticamente fue producida uniendo esterona a la peroxidasa a través del grupo 11-hidroxí, usando en ambos casos el mismo reactivos

25. H.N. Eisen y G.W. Siskind, *Biochemistry* **3**, 1964, 996-1008.

26. D.S. Kabakoff en "Enzyme-Immunoassay", E.T. Maggio, Ed., CRC Press, Boca Raton, 1980. p.79.

químicos para la condensación. La heterología de puente ocurre cuando, por ejemplo, un grupo separador succinil se utiliza para producir el agente inmunológico, y utilizan a un grupo glutaril para conjugar al hapteno con la etiqueta. Finalmente, la heterología de sitio ocurre cuando el mismo grupo separador esta conectado con diversos sitios en el hapteno, por ejemplo los grupos 11-hidroxi y 17-hidroxi en el estrógeno.

En ausencia de interferencias inespecíficas, cualquier combinación heteróloga del agente inmunogénico y hapteno marcado resulta en mejores límites de detección, a menudo tanto como cien veces menores que los mismos ensayos realizados sin heterología. Esto es porque la heterología reduce la constante de asociación para la unión del hapteno marcado con el anticuerpo, y porque el hapteno libre desplazará al hapteno marcado más fácilmente. Concentraciones más bajas de hapteno libre son así detectadas más fácilmente.

Mientras que la heterología mejora los límites de detección de un análisis, aumenta perceptiblemente las reacciones cruzadas que ocurren con analitos similares. Se ha encontrado que los anticuerpos con la mejor selectividad son producidos cuando los agentes inmunogénicos son preparados uniendo haptenos en un sitio lejano de las regiones de la molécula en donde las especies interferentes tienen diferencias estructurales leves. En un análisis para la morfina (Figura 6.12), por ejemplo, el agente inmunogénico y el conjugado enzima-hapteno fueron preparados exactamente de la misma manera para cada análisis ensayado, mientras que los sitios que a los que se ligaban fueron variados de un ensayo al siguiente.²⁷

Nombre	R	R'
Morfina	H	CH ₃
Codeína	CH ₃	CH ₃
Normorfina	H	H
Norcodeína	CH ₃	H

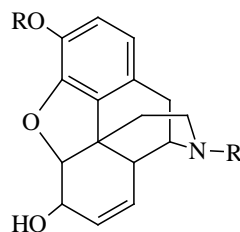


Figura 6.12. Estructura de la morfina y especies interferentes.

La selectividad de cada análisis fue determinada midiendo las respuestas a la especie interferente y a la morfina en concentraciones fijas e idénticas. Las estructuras de las conjugaciones, y las selectividades de los análisis se muestran en la Figura 6.13.

Compuesto	A	B	C	C'	D	D'	D''
Morfina	1,0	1,0	1,0	1,0	0,1	0,001	1,0
Codeína	1,0	1,0	0,83	0,1	0,0003	1,0	0,048

27. B.K. Van Weemen y A.H.W.M. Schuurs, *Immunochemistry* **12**, 1975, 667-670.

VI. INMUNOENSAYOS CUANTITATIVOS UTILIZANDO MARCADORES (LABELS)

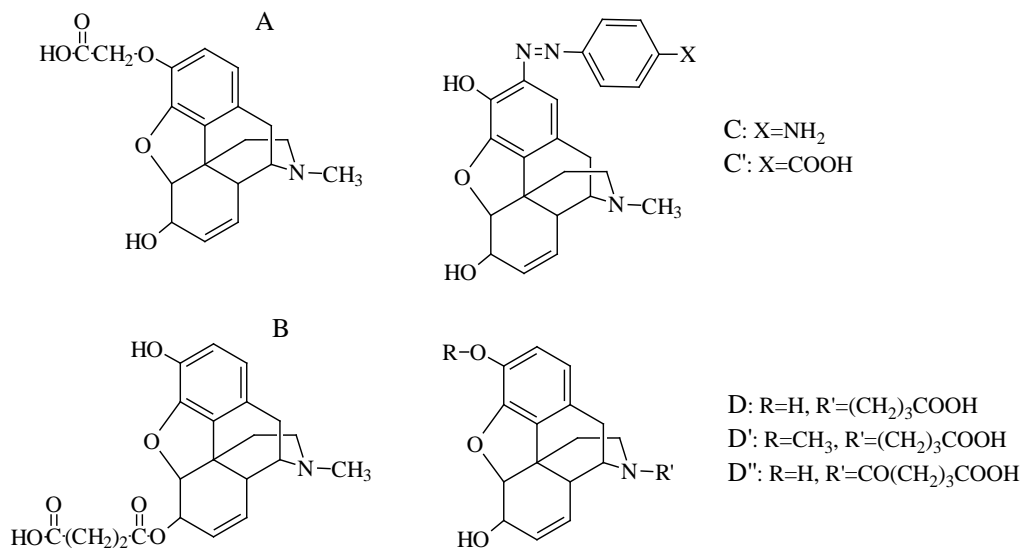


Figura 6.13. Selectividad del ensayo para morfina en presencia de codeína.

Estos experimentos de heterología de sitio mediante la utilización del ensayo para la morfina muestran que la sustitución en posición del R' con grupos separadores produjo la mejor selectividad para la morfina respecto a la codeína. Esto es porque el grupo R' es igual para la morfina y la codeína, y porque el grupo del R' está lejos del grupo R, que es donde están las diferencias estructurales entre la morfina y la codeína. Los anticuerpos desarrollados contra esta conjugación tienen de este modo un paratope complementario a esta región más expuesta del agente inmunogénico, y poseen una alta selectividad para la morfina.

La reactividad cruzada de los anticuerpos policlonales preparados contra un conjugado de atrazina con una proteína (ligada al cloro) fue evaluada, usando atrazina marcada con peroxidasa, ligada de manera similar, para determinar la confiabilidad de inmunoensayo tipo kit, competitivo, recientemente disponible comercialmente para el monitoreo ambiental de la atrazina.²⁸ Una amplia variedad de compuestos similares (Figura 6.14) fue analizada, y las concentraciones dadas al lado de los compuestos indican la concentración aparente de atrazina que sería registrada erróneamente de las respuestas obtenidas cuando cada uno de estos interferentes está presente, en una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$.

28. D.A. Goolsby, E.M. Thurman, M.L. Clark y M.L. Pomes en "Immunoassays for Trace Chemical Analysis" (ACS Symp. Ser. 451), M. Vanderloon, L.H. Stanker, B.E. Watkins y D.W. Roberts, Eds., American Chemical Society, Washington, D.C., 1990. pp. 86-99.

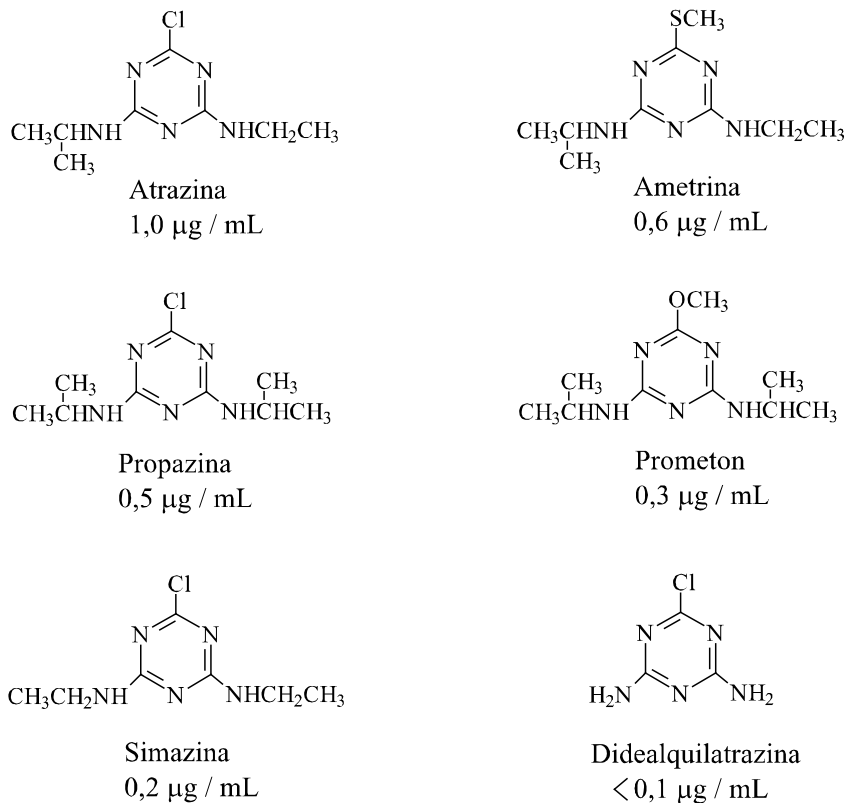


Figura 6.14. Estructuras químicas y respuestas en un inmunoensayo utilizando concentraciones de 1 µg/mL de sustancias que interfieren con la atrazina en un inmunoensayo comercial para la detección de atrazina.

La reactividad cruzada fue más alta con aquellos compuestos cuya estructura se asemeja en gran medida a la atrazina, es decir, los que poseían grupos 4-etilamino y 6-isopropilamino. El sustituyente en la posición 2 tiene poco efecto en respuesta, como era de esperar dado que éste es el sitio usado para ligar la atrazina a la proteína portadora y el marcador de peroxidasa. Los resultados indican que la respuesta relativa del inmunoensayo está relacionada con el reconocimiento y la unión del anticuerpo a las cadenas laterales N-alquílicas en el anillo de triazina.

Las *interferencias no específicas* aumentan o disminuyen los valores aparentes de un análisis, sin reaccionar específicamente con el anticuerpo o el antígeno. Componentes tales como lípidos, pigmentos y enzimas endógenas pueden fijarse por adsorción o unirse no específicamente a la fase sólida o a los reactivos, o pueden afectar el paso de detección. Reactivos bloqueadores²⁹ son utilizados comúnmente para prevenir la adsorción no específica de proteínas

29. A.M. Campbell, "Monoclonal Antibody and Immunosensor Technology" Elsevier, New York, 1991. pp. 68-69.

sobre las placas multipozo después de la inmovilización del anticuerpo; la albúmina u otras proteínas se utilizan para saturar las áreas del soporte sólido que no contiene el anticuerpo, para prevenir futuras uniones adicionales. En casos especiales, las muestras pueden contener anticuerpos contra alguno de los reactivos del inmunoensayo; por ejemplo, anticuerpos anti-insulina endógenos están presentes en el suero de los pacientes tratados con insulina de origen vacuno o porcino, siendo una interferencia que invalida la medida de los niveles de insulina por algunos inmunoensayos.³⁰ En los análisis de tiroxina, las interferencias incluyen algunas variantes genéticas de la albúmina humana del suero, que tienen alta afinidad para por la tiroxina.^{31,32}

6.6 Lecturas sugeridas

T.T. Ngo, Ed., “*Nonisotopic Immunoassay*”, Plenum Press, New York, 1988.

T.T. Ngo y H.M. Lenhoff, Eds., “*Enzyme-Mediated Immunoassay*”, Plenum Press, New York, 1985.

E.T. Maggio, “*Enzyme-Immunoassay*”, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980.

R.M. Nakamura, Y. Kasahara y G.A. Rechnitz, Eds., “*Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s*”, American Society for Microbiology, Washington DC, 1992.

C.P. Price y D.J. Newman, Eds., “*Principles and Practice of Immunoassay*”, Macmillan (Stockton Press), New York, 1991.

D. Wild, Ed., “*The Immunoassay Handbook*”, 2^{da} Ed., Nature Publishing Group, New York, 2001.

6.7 Problemas

1. En la reacción de unión entre cada uno de los pares siguientes de reactivos, indique qué componente sería normalmente descripto como el ligando:

- (a) Estrógeno y anticuerpo anti-estrógeno,
- (b) Anti α -fetoprotein humana (de cabra) y α -fetoprotein humana,

30. M. Rendell, R.G. Hamilton, H.M. Drew y N.F. Adkinson (Jr.), *Am. J. Med. Sci.* **282**, 1981, 18-26.

31. C.E. Petersen, C.E. Ha, M. Mardel y N.V. Bhagavan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**, 1985, 1121-1129.

32. J.R. Stockigt, V. Stevens, E.L. White, y J.W. Barlow, *Clin. Chem.* **29**, 1983, 1408-1410.

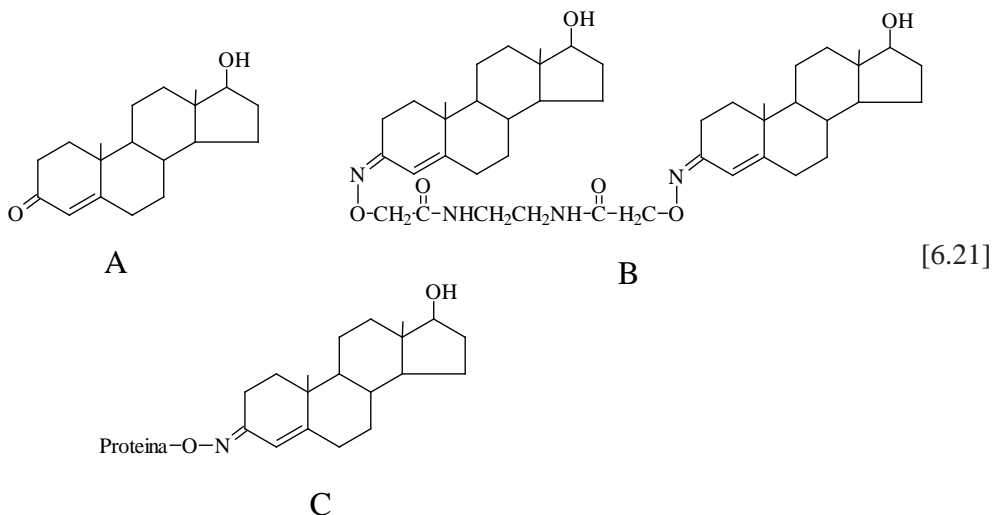
- (c) Anticuerpo de ratón y anti-Ig de ratón (de conejo), y
- (d) Receptores nicotínicos de la acetilcolina y acetilcolina.

2. En un inmunoensayo heterogéneo, competitivo, donde se marca el ligando:

- (a) ¿Cuál componente esta unido a la fase sólida,
- (b) cuál componente(s) es/está presente en una concentración limitada, y
- (c) cuál componente(s) es/está presente en exceso?

3. De la lista de los marcadores utilizados en inmunoensayos dados en la Tabla 6.1, clasifique cada tipo de marcador respecto a la producción de (i) un solo acontecimiento perceptible, (ii) una señal continua, o (iii) la amplificación catalítica de la señal.

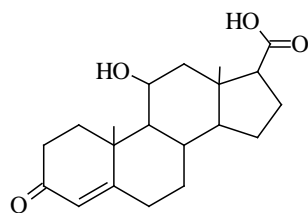
4. Una nueva estrategia se ha desarrollado recientemente para realizar inmunoensayos competitivos tipo sándwich de moléculas pequeñas, usando tecnología automatizada de ELISA y placas multipozo de poliestireno. El método se basa en la formación y cuantificación del complejo $Ab:H-H:Ab^*$, donde Ab y Ab^* son los anticuerpos inmovilizados y marcados, respectivamente, y $H-H$ es un análogo sintético de dos moléculas unidas de hapteno H . Este análogo doble del hapteno compete con el hapteno monomérico (el analito) para los sitios de unión presentes en el anticuerpo inmovilizado. Este análisis se ha probado utilizando como analito modelo la testosterona (A), usando como especie competidora la bis-testosterona (B) para el inmunoensayo sándwich competitivo, y los anticuerpos (ambos Ab y Ab^*) que fueron producidos contra el agente inmunogénico que se muestra en (C), estructuras que se muestran en la Ecuación 6.21.



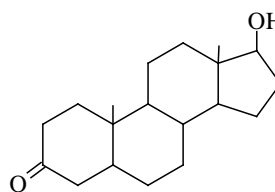
- (a) ¿Cuáles de estas cuatro especies, Ab , Ab^* , $H-H$ y H , deben estar presentes en una concentración limitada, y cuáles debe estar presente en exceso?

VI. INMUNOENSAYOS CUANTITATIVOS UTILIZANDO MARCADORES (LABELS)

- (b) ¿Además de las especies $Ab:H-H:Ab^*$, que otras especies involucrando el Ab y cualquiera de las siguientes, Ab^* , H-H y H existirán en las placas multipozo de poliestireno luego de la incubación final con el Ab^* y el lavado posterior que elimina el exceso de reactivos?
- (c) Tres interferentes potenciales se muestran abajo en las estructuras D, E y F (Eq. 6.22). ¿Cuáles de éstos probablemente presenten la mayor reactividad cruzada en un inmunoensayo competitivo tipo sándwich, y cuáles espera que presenten la menor reactividad cruzada? ¿Por qué?

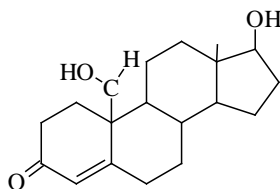


D



E

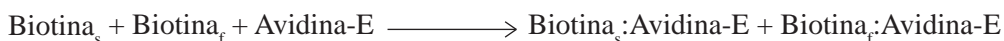
[6.22]



F

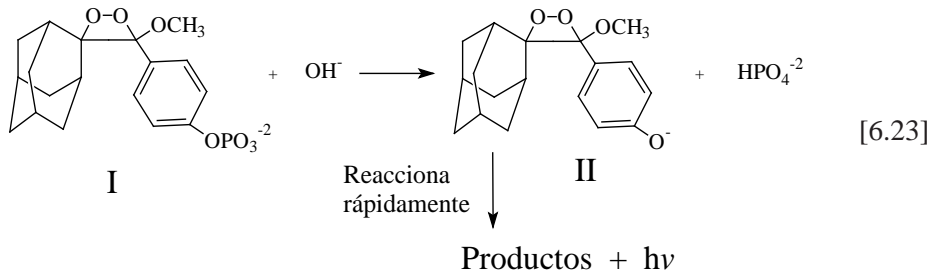
- (d) Dibuje un grafico de la señal del marcador vs. el $\log[\text{testosterona}]$ que esperarías obtener en este tipo de análisis.

5. La deficiencia de la biotina es indicadora de un número de problemas metabólicos en los recién nacidos, por lo que la cuantificación de biotina representa un método de “investigación general” (screening method) para estas enfermedades. Recientemente, un nuevo método fue propuesto para la cuantificación de biotina en suero. El método ha sido llamado ELLSA (enzyme-linked ligand sorbent assay), y se basa en la siguiente reacción competitiva:



donde Biotina_s y Biotina_f son las formas fijadas por adsorción y las formas libres de la biotina (el analito), respectivamente. La Avidina-E es un conjugado Avidina-Fosfatasa Alcalina, que se agrega en cantidad limitada. Después de un período de incubación, los reactivos que no se han unido a las placas multipozo son lavados, y se cuantifica la actividad enzimática remanente usando un método a tiempo fijo después de la adición de exceso de sustrato.

- (a) Bosqueje el diagrama de la actividad enzimática vs. el $\log[\text{Biotina}_p]$ que esperaría para este tipo de análisis.
- (b) Un sustrato sintético (I, como puede verse mas abajo) fue utilizado para las medidas de la actividad enzimática. Este sustrato experimenta el defosforilación en la presencia de la fosfatasa alcalina, obteniéndose un intermediario inestable (II) que se descompone en una reacción quimioluminiscente (Eq. 6.23):



¿Si el K_m de la fosfatasa alcalina para el compuesto I es 0,10 mM, qué concentración de este sustrato se debe utilizar para la determinación de la actividad enzimática?

- (c) Dibuje el diagrama de la intensidad de luz vs. tiempo que sería obtenido por la medida continua de la luz emitida en un pozo utilizado como control, donde no se había agregado biotina libre a la mezcla de reacción. ¿Cómo se diferencia este diagrama de uno más típico, obtenido al graficar absorbancia vs. tiempo, el que podría ser obtenido si el sustrato diera lugar a un producto coloreado?

6. En un inmunoensayo heterogéneo tipo sándwich empleando un sistema de excitación de fluorescencia (Eq. 6.7 y Figura 6.6), dibuje los diagramas de intensidad de emisión vs. el $\log[\text{Ag}]$ que esperaría si la emisión de F1 (i) y F2 (ii) fueron medidas.

CAPÍTULO 7

BIOSENSORES

7.1 Introducción

La posibilidad de cuantificar analitos de importancia biológica y ambiental en tiempo real e *in situ* ha sido por mucho tiempo una meta de la investigación analítica. La necesidad del control continuo de la concentración de diversos sustratos en medios de cultivo microbiológico, los pesticidas y los contaminantes ambientales en aguas naturales, y los metabolitos de productos bioquímicos o farmacéuticos en organismos vivos han conducido a una actividad importante en el campo de la investigación de los denominados biosensores. Los biosensores son dispositivos, idealmente pequeños y portátiles, que permiten la cuantificación selectiva de analitos químicos y bioquímicos. Consisten en dos componentes: un transductor y el elemento bioquímico de reconocimiento. El reconocimiento bioquímico es logrado explotando la natural selectividad de diversas especies tales como enzimas, anticuerpos, quimiorreceptores y ácidos nucleicos. En presencia del analito, estos agentes, inmovilizados en la superficie del transductor, causan un cambio en una característica medible en el ambiente local cerca de la superficie del transductor. El transductor sensa esta característica, y convierte el acontecimiento químico del reconocimiento en una señal electrónica medible. Los transductores pueden medir procesos electroquímicos, ópticos, térmicos o de adsorción que cambian en la presencia del analito.

El primer biosensor fue introducido por Clarke en 1962,¹ y consistió en una enzima, glucosa oxidasa, atrapada en la superficie de un electrodo de platino por una membrana semipermeable de diálisis, que permitió que los sustratos y los productos difundieran libremente hacia y desde la capa de la enzima, según puede observarse en la Figura 7.1. La velocidad de la reacción enzimática es proporcional a la concentración del sustrato en la solución externa. La conversión de la glucosa y del oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno y glucanólactona puede ser detectada fácilmente mediante técnicas electroquímicas, mediante la reoxidación del peróxido de hidrógeno a oxígeno molecular en la superficie del electrodo de platino. La corriente generada depende de la concentración local de H_2O_2 , y por lo tanto en la concentración de glucosa en el seno de la solución.

1. L.C. Clark, Jr., y C. Lyons, *Ann, N. Y. Acad. Sci.* **102**, 1962, 29-45.

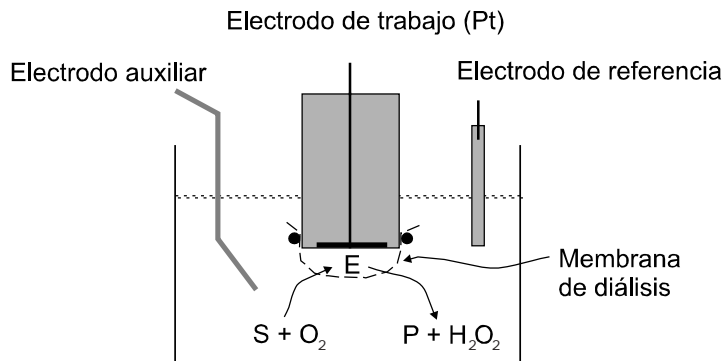


Figura 7.1. Biosensor amperométrico para glucosa utilizando glucosa oxidasa para el reconocimiento químico.

La magnitud de la respuesta en corriente del biosensor amperométrico para glucosa mostrado en la Figura 7.1 depende de cuatro factores principales. Primero, las cinéticas del transporte de masa determinan las velocidades a las cuales los sustratos pueden alcanzar la enzima, y los productos ser removidos de la capa de reacción en la que se encuentra atrapada la enzima. En segundo lugar, la cinética de la enzima determina la velocidad a la cual el H_2O_2 , la especie detectada, es genera dentro de esta capa de la reacción. La cinética heterogénea de la reacción electroquímica determina la velocidad a la cual el H_2O_2 producido enzimáticamente se puede convertir en O_2 , generando la señal analítica medida. Finalmente, algún H_2O_2 se escapará a través de la membrana semipermeable al seno de la solución sin experimentar la oxidación; la fracción oxidada permite calcular la eficacia de la conversión, y las señales medidas se relacionan directamente con este factor. Es importante recordar que todos estos procesos ocurren solamente dentro de la fina capa de reacción en la superficie del transductor; las concentraciones de estado estacionario de reactivo y de productos existen dentro de esta capa cuando se alcanza una señal constante del transductor. Los biosensores basados en enzimas generalmente no alteran las concentraciones del analito en el seno de la solución.

El biosensor para glucosa de la Figura 7.1 representa la primera combinación acertada de un agente bioquímico de reconocimiento con un transductor, pero posee un número de deficiencias que imposibilitan su uso para la cuantificación *in vivo* o *in situ* de glucosa. Una dificultad obvia para el uso *in vivo* es su tamaño, pero inclusive utilizando modernas versiones miniaturizadas de este sensor, dificultades asociadas a respuestas inmunológicas de los mamíferos al material de la membrana suele ocasionar fallas en las mediciones en tiempos relativamente cortos (semanas). Además, las corrientes de la respuesta alcanzadas en ambientes *in vivo* e *in situ* dependerán no solamente de la concentración del analito (glucosa), pero también de la concentración de oxígeno disuelto, que puede ser muy baja, o variable, conduciendo a los resultados no fiables. Mucha de la investigación moderna en el área de los biosensor se dirige hacia el diseño de sistemas que no necesitan reactivos o

compuestos otros que el analito (“reagentless” biosensors), donde la concentración de una sola especie (el analito) determina la respuesta.

Puesto que las enzimas son los agentes químicos más utilizados como elementos de reconocimiento, este capítulo comienza con una descripción teórica de las respuestas de los biosensores enzimáticos, e identifica algunos parámetros de importancia para optimizar su respuesta. Un examen representativo de los tipos de transductores y de otros agentes químicos que son investigados actualmente como elementos de reconocimiento es presentado aquí, seguido por una discusión de los métodos que pueden utilizarse para la evaluación de los biosensores.

7.2 Respuesta de los biosensores enzimáticos²

La descripción teórica de la respuesta de los biosensores enzimáticos asume que dentro de la capa de la enzima existe un estado estacionario en las concentraciones de sustratos y productos. Debido a que la reacción está ocurriendo efectivamente en una superficie de dos dimensiones, más bien que en el seno de una solución o medio tridimensional, los índices de los varios procesos implicados en la generación de la señal se representan como flujos, y las magnitudes de estos flujos dependen de distancia desde la superficie del transductor (es decir, existen gradientes de concentración). El flujo, j , es igual a la velocidad de la reacción homogénea multiplicada por el grosor de la capa de reacción enzimática, l , según se expresa a continuación:

$$j = (\text{velocidad}) \times l$$

Para una velocidad homogénea de reacción dada en mol/(cm³s) y un grosor de la capa de la enzima dado en centímetros, se obtienen unidades del flujo de mol/(cm²s). La importancia del área superficial del transductor en la determinación de la magnitud de la respuesta es así inmediatamente evidente. La naturaleza bidimensional de la reacción da lugar a los gradientes de la concentración para el sustrato y el producto: en la superficie del transductor, la concentración del sustrato es más baja, y la concentración del producto es más alta que en el seno de la solución. Estos gradientes de concentración existen sobre una distancia, denominada capa de difusión, δ , que tiene determinado espesor. El transporte difusional del sustrato a través de esta capa es representado por la reacción dada en Eq. 7.2, y ocurre a una velocidad proporcional a la diferencia de la concentración entre la superficie del transductor y en el seno de la solución, Eq. 7.3:

2. M.J. Eddowes en “*Biosensors: A Practical Approach*”, A.E.G. Cass, Ed., Oxford University Press, New York, 1990. pp.211-237.

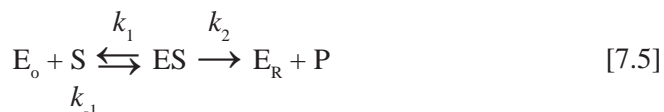


$$j_s = k_s([S]^* - [S]_o), \quad [7.3]$$

donde j_s es el flujo del sustrato, $[S]^*$ es la concentración en el seno de la solución, y $[S]_o$ es la concentración superficial del sustrato, y k_s es la velocidad del transporte de masa, que es igual al coeficiente de difusión del sustrato, D_s , dividido por el grueso de la capa de difusión. Eq. 7.4:

$$k_s = D_s/\delta. \quad [7.4]$$

Una vez que el sustrato llega a la capa de reacción, la aplicación de la cinética simple de Michaelis-Menten (Eq. 7.5 para enzimas oxidoreductasas, donde E_o y E_R representan la enzima oxidada y reducida, respectivamente) permite obtener los flujos dando lugar a la formación del complejo enzima-sustrato (j_c) y para la descomposición de este complejo para dar lugar al producto (j_p), Eqs. 7.6 y 7.7:



$$j_c = l(k_1[E_o][S] - k_{-1}[ES]) \quad [7.6]$$

$$j_p = lk_2[ES] \quad [7.7]$$

Estos flujos son simplemente las velocidades homogéneas de la reacción multiplicadas por el grosor de la capa enzimática de la reacción, según se expreso en la Eq. 7.1.

Para los transductores amperométricos, es la regeneración del E_o por la reacción con un oxidante (O_2 u otra especie mediadora M^{2+}) la que resulta en la especie realmente medida por el transductor. Esta reacción, Eq. 7.8, da lugar a un flujo para la regeneración de E_R dado por Eq. 7.9:



$$j_E = lk_E[E_R][M^{2+}] \quad [7.9]$$

Recordando que a cualquier distancia de la superficie del transductor, la concentración total de la enzima es igual a la suma de las concentraciones de las tres especies de la enzima

($[E]_T = [E_0] + [ES] + [E_R]$), y fijando $j = j_s = j_c = j_p = j_e$ (como un resultado directo de la asunción de estado estacionario), el flujo j es descrito por la Eq. 7.10:

$$1/j = (K_m' / \{lk_2[E]_T([S]^* - j/k_s)\}) + 1/\{lk_2[E]_T\} + 1/\{lk_E[E]_T[M^{2+}]\} \quad [7.10]$$

Según se lo ha expresado en su forma inversa, el flujo puede descomponerse en tres términos. El primero describe el transporte del sustrato y la formación del complejo ES, el segundo describe la descomposición del complejo del ES, y el tercer término describe la regeneración del E_0 por el oxidante. Idealmente, la descomposición del ES y la regeneración del E_0 son rápidas con respecto a la formación del complejo, de modo que $[S]_0 = 0$; en este caso, solamente el primer término de Eq. 7.10 es significativo, y puede ser simplificado a Eq. 7.11:

$$1/j = K_m' / \{lk_2[E]_T[S]^*\} + 1/\{k_s[S]^*\} \quad [7.11]$$

El primer término de Eq. 7.11 se relaciona con la cinética de la enzima, mientras que el segundo término explicita la dependencia del flujo respecto al transporte de sustrato a la capa de reacción. Puede entonces observarse que el flujo incrementa el aumento de la concentración del sustrato (analito), con el aumento de la concentración de la enzima en la capa de la reacción, y con el aumento del grosor de la capa de reacción.

La corriente medida por un electrodo amperométrico es directamente proporcional al flujo descrito por la Eq. 7.11, con las constantes de proporcionalidad n (electrones en la reacción electroquímica equilibrada), F (constante de Faraday, 96.487 coulombs/mol), A (área del electrodo) y B (Eficacia de colección, expresada como fracción):

$$i = nFABj \quad [7.12]$$

Substituyendo por el flujo, podemos obtener:

$$i = nFAB\{lk_2[E]_T k_s / (K_m' k_s + lk_2[E]_T)\} [S]^* \quad [7.13]$$

Se observa en la Eq. 7.13 que la señal medida es directamente proporcional a la concentración del analito. Esta relación se sostendrá mientras que la $[S]_0 = 0$, esto es, a concentraciones del analito suficientemente bajas para asegurar la conversión completa y rápida en producto dentro de la capa de reacción. A concentraciones más altas del analito, $[S]_0 > 0$, y la corriente medida alcanza un valor límite máximo, dando lugar a una meseta. Esta expresión fue derivada asumiendo una serie de parámetros, que permitieron la simplificación; por ejemplo, concentraciones uniformes de sustrato y de producto dentro de la capa de la reacción (no se consideraron gradientes); la descomposición rápida del complejo ES y la

rápida regeneración de E_0 fueron asumidas. Se han realizado derivaciones más detalladas que no asumen estas simplificaciones.^{3,4}

Muchos los biosensores enzimáticos no se basan en la consumición de uno de los productos para la generación de una señal. Por ejemplo, los transductores de fibra óptica confían en las medidas locales de absorbancia o de fluorescencia, donde las magnitudes de la señal se relacionan con las concentraciones de estado estacionario del producto. Similarmente, los transductores potenciométricos miden, pero no consumen, producto. Estos biosensores son descritos mediante las ecuaciones de estado estacionario de flujo para la concentración local del producto [P] dentro de la capa de reacción (la solución de estas ecuaciones se simplifica en gran medida si se asume concentraciones uniformes dentro de la capa de la reacción). Las regiones analíticamente útiles de estas curvas se encuentran otra vez para $[S]^* < K_m'$; entonces, [P] estará dada por la Eq. 7.14:

$$[P] = (1 + k_2[E]_T/k_3K_m') [S]^* . \quad [7.14]$$

Para los transductores ópticos, las señales medidas son directamente proporcionales a [P], de modo que, otra vez, el grosor de la capa de reacción y la cinética de transporte de masa determinan la sensibilidad del biosensor, y las señales son directamente proporcionales a la concentración del analito. Para los transductores potenciométricos, las señales son proporcionales al $\log[P]$, y por lo tanto al $\log[S]^*$.

Mientras que los biosensores enzimáticos emplean solamente uno de muchos agentes químicos posibles para el reconocimiento, son los dispositivos actualmente más estudiados e íntegramente descritos. Otros agentes que pueden ser utilizados para el reconocimiento, tales como anticuerpos y quimioreceptores, se basan en las interacciones primarias de unión para la preconcentración de la especie detectable en la superficie de un transductor. La sección siguiente muestra algunos ejemplos de la diversidad de configuraciones de detección posibles.

7.3 Ejemplos de biosensores

7.3.1 Sensor amperométrico para glucosa mediado por ferroceno⁵

Este sensor enzimático utiliza la glucosa oxidasa (GO) como elemento de reconocimiento bioquímico, y un electrodo amperométrico formado por una lamina de grafito como el

3. C. Bourdillon, C. Demaille, J. Moiroux y J.M. Saveant, *Acc. Chem. Res.* **29**, 1996, 529-535.

4. P.N. Bartlett y K F.E. Pratt, *J. Electroanal. Chem.* **397**, 1995, 61-78.

5. A.E.G. Cass, G. Davis, G.D. Francis, H.A.O. Hill, W.J. Aston, I.J. Higgins, E.V. Plotkin, D.L. Scott y A.P.F. Turner, *Anal. Chem.* **56**, 1984, 667-671.

transductor. Se diferencia del primer biosensor reportado para glucosa, cuyas características se discutieron en la introducción de este Capítulo en que un mediador, el 1,1'-dimetilferrocianuro, substituye el oxígeno molecular como el oxidante que regenera la enzima activa. La reacción enzimática se presenta en la Eq. 7.15, y la reacción electroquímica que proporciona la corriente medida se observa en la Eq. 7.16.



Mientras que la glucosa oxidasa es muy selectiva para su sustrato primario, la β -D-glucosa, un número de oxidantes de bajo peso molecular puede ser utilizado en lugar del oxígeno molecular. El ferroceno utilizado en este sensor es adsorbido junto con la GO a la superficie de la lámina de grafito, y la superficie del sensor luego se cubre con una membrana de diálisis. El sensor que resulta se utiliza en un sistema de tres electrodos, que incluye un electrodo de referencia y un contra electrodo, y el potencial se mantiene a +0,16V versus SCE (electrodo de calomel saturado), de tal modo de generar la especie oxidada del mediador. En este potencial, cualquier H_2O_2 generado por la reacción competitiva de la enzima reducida con oxígeno molecular sigue siendo no detectable, y el potencial aplicado (relativamente bajo) asegura que interferencias electroactivas, generalmente presentes en líquidos biológicos, tales como ácido ascórbico, no sean oxidadas. La Figura 7.2 muestra un diagrama del sensor, y las curvas de calibración para la glucosa que han sido registradas en soluciones saturadas con nitrógeno, aire o bien oxígeno.

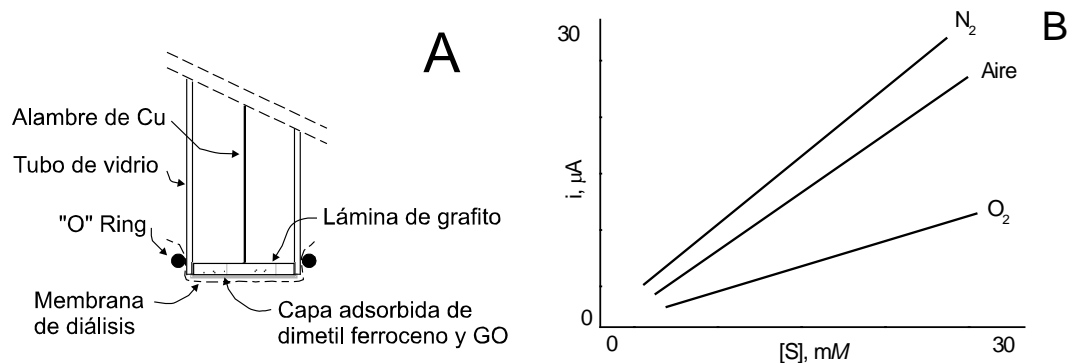


Figura 7.2. A) Sensor para glucosa mediado por ferroceno; (B) Curvas de calibración registradas en soluciones saturadas con N_2 , aire y O_2 .

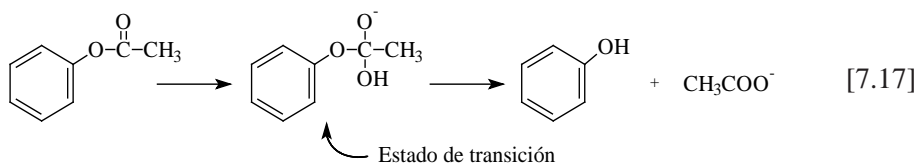
Las curvas de calibración en la Figura 7.2B muestran que existe una diferencia muy pequeña en la señal electroquímica, cuando se comparan las obtenidas en soluciones en

las cuales el oxígeno está ausente y aquellas en las que el oxígeno está presente en los niveles atmosféricos (0,2 mM). Una Interferencia significativa de la reacción competitiva con el oxígeno ocurre solamente a altas concentraciones de oxígeno (saturación) de cerca de 1,2 mM.

Estos principios se han incorporado en los dispositivos de análisis que son utilizados en el hogar por los diabéticos, usando un derivado del ferroceno como mediador. Una gota de la sangre del paciente se pone sobre una tira (strip) de prueba que contiene (i) el ferroceno y GO adsorbida sobre un conductor, y (ii) un conductor que actúa como contraelectrodo. La tira de prueba se inserta en un potenciostato portátil, donde la corriente medida por el dispositivo se relaciona directamente con la concentración de la glucosa de la sangre. Un dispositivo similar para la cuantificación del lactato está disponible, y otro, para la cuantificación del colesterol, posiblemente será introducido en un futuro cercano.

7.3.2 Biosensor potenciométrico para fenil acetato⁶

El fenil acetato se ha elegido como analito modelo para la evaluación de *anticuerpos catalíticos* como agentes químicos de reconocimiento. Un anticuerpo catalítico es un anticuerpo producido contra un agente inmunogénico, donde este agente inmunogénico contiene un análogo de un estado de transición para una determinada reacción química. En este ejemplo, la reacción es el clivado o rompimiento hidrolítico de la unión éster del fenil acetato:



Los anticuerpos producidos contra el análogo del estado de transición (Fig. 7.3) se unirán al estado de transición de la reacción de hidrólisis, disminuyendo la energía de activación y por lo tanto catalizando la reacción. Estos anticuerpos fueron inmovilizados en la superficie de un electrodo de pH usando una membrana de diálisis (Figura 7.4A). La reacción (Eq. 7.17) produce un cambio en el pH local en la superficie del electrodo, puesto que el ácido acético es uno de los productos. El pH medido por lo tanto disminuye cuando la concentración de fenil acetato aumenta en el seno de la solución, puesto que la concentración de estado estacionario del ácido acético en la capa de reacción aumenta (Figura 7.4B).

6. G.F. Blackburn, D.B. Talley, P.M. Booth, C.N. Durfor, M.T. Martin, A.D. Napper y A.R. Rees, *Anal. Chem.* **62**, 1990, 2211-2216.

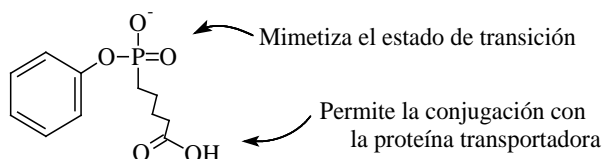


Figura 7.3. Análogo del estado de transición (hapteno) utilizado para la generación de los anticuerpos catalíticos capaces de hidrolizar al fenil acetato.

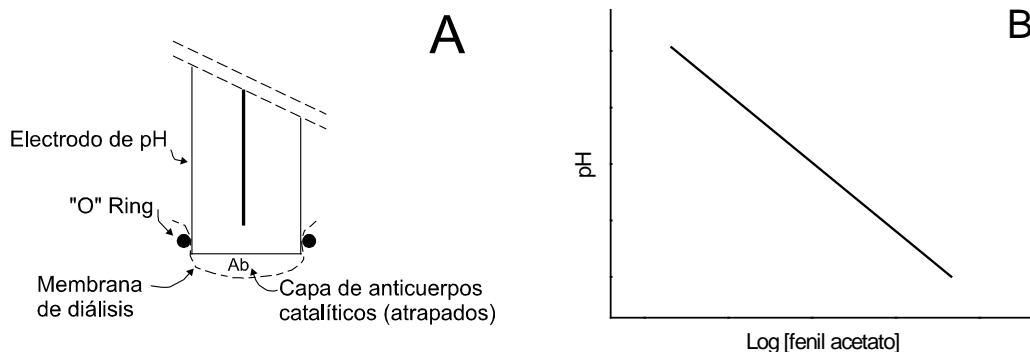


Figura 7.4. (A) Diagrama del sensor para fenil acetato, y (B) curva de calibración.

El rango dinámico de respuesta del sensor al fenil acetato es de 0,02 mM a 0,50 mM, y el límite de detección informado ha sido de 5 μ M. Los estudios de la selectividad de este sensor han demostrado que un número de compuestos estructuralmente similares producen respuesta, particularmente las que contienen el grupo RCOOC_6H_5 . Sin embargo, la selectividad es similar a la de enzimas hidrolíticas. La investigación también ha demostrado que la concentración de la solución tampón utilizada es crítica respecto a la magnitud de las señales obtenidas, y una dependencia lineal inversa del $\log(\text{señal})$ versus $\log[\text{buffer}]$ fue obtenida para concentraciones entre 10^{-4} a 10^{-2} M para una solución tampón Tris (0,25 mM).

El biosensor para fenil acetato no es de gran importancia comercial, sino que ilustra el reciente uso de anticuerpos como agentes químicos de reconocimiento. En principio, los anticuerpos catalíticos pueden ser producidos para cualquier reacción, siempre y cuando análogos del estado de transición (pero estables) puedan ser preparados.

7.3.3 Inmunosensor potenciométrico para digoxina⁷

Este biosensor emplea un electrodo ión-selectivo de potasio (K^+) como el transductor, y el reconocimiento químico se logra mediante un anticuerpo anti-digoxina y un conjugado de la digoxina con un éter corona (crown ether). Un diagrama del sensor se muestra en la Figura 7.5.

7. D.L. Bush y G.A. Rechnitz, *J. Membrane Sci.* **30**, 1987, 313-322.

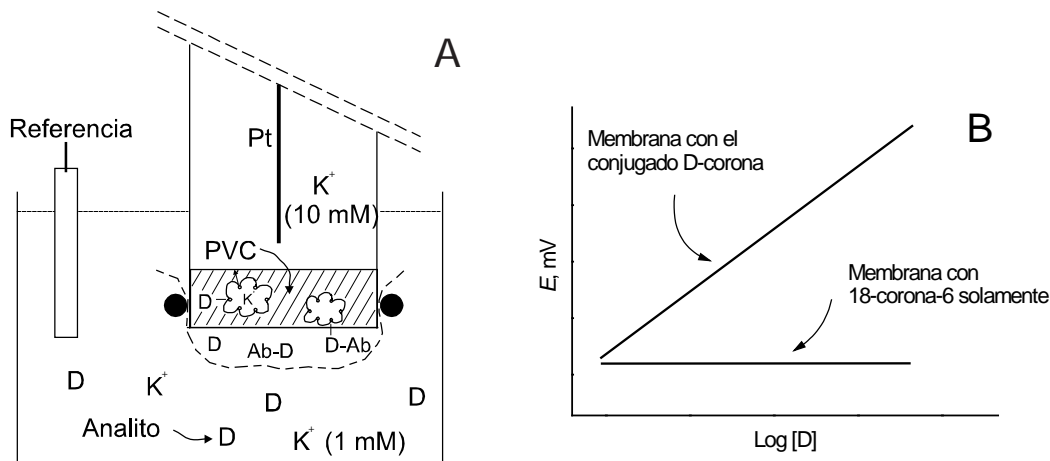


Figura 7.5. (A) Inmunosensor para digoxina, y (B) curvas de calibración para digoxina.

En este dispositivo, una membrana de polivinilcloruro (PVC) separa una solución interna de K^+ de una capa externa del anticuerpo anti-digoxina que es atrapada en la superficie del sensor utilizando una membrana de diálisis. La conjugación del éter corona con la digoxina, que se une selectivamente al K^+ , está presente solamente en la capa de PVC debido a sus características hidrofóbicas. La competición entre la digoxina libre (analito) que puede cruzar libremente la membrana de diálisis y el conjugado (digoxina-corona) en la interfase PVC-fase acuosa para el anticuerpo en la capa de la reacción causa un cambio en el transporte de K^+ a través de la membrana del PVC, debido a que el anticuerpo unido al conjugado es mantenido en la interfase. Este biosensor incorpora los principios de los inmunoensayos competitivos, y permite que la interacción antígeno-anticuerpo sea observada a medida que procede, midiendo el potencial en función del tiempo, a partir de que la digoxina se agrega a la solución en la que se encuentra el sensor. El tiempo de reacción de este sensor es lento, cerca de 10 minutos, y ésto ha imposibilitado su uso en situaciones prácticas.

7.3.4 Biosensor basado en fluorescencia de onda evanescente para bungarotoxina⁸

Este biosensor emplea una fibra óptica del cuarzo como transductor, y el elemento químico de reconocimiento es el receptor nicotínico de la acetilcolina (AChR). El receptor es una proteína de la membrana celular que atraviesa la bicapa lipídica; se une a la acetilcolina rápida y reversiblemente, cambiando su forma luego de la unión, para permitir el transporte de iones a través de un canal creado a través de la membrana. Existen gradientes

8. K.R. Rogers, J.J. Valdes y M.E. Eldefrawi, *Anal. Biochem.* **182**, 1989, 353-359.

de concentración de iones sodio y potasio a través de las membranas *in vivo*, y un canal de iones abierto permite el flujo de iones, y por lo tanto una corriente de iones a través de la membrana se produce. El receptor de la acetilcolina se aísla del tejido muscular especializado para producir corriente (órgano eléctrico) de anguilas eléctricas y rayas, donde este receptor se encuentra en altas concentraciones. Los receptores aislados se unen a la acetilcolina y sus análogos, así como la α -bungarotoxina (BTX, una proteína aislada de veneno de serpientes) y las neurotoxinas tales como la tubocurarina. El receptor se comporta como un anticuerpo que tiene sitios de unión selectivos, pero no posee ninguna característica catalítica. Puede ser inmovilizado por los métodos estándares utilizados para la inmovilización de proteínas.

Este biosensor basado en el receptor para acetilcolina es de tipo competitivo, estableciéndose esta competencia entre los receptores inmovilizados por adsorción sobre la superficie de una fibra óptica de cuarzo y sus ligandos. La bugarotixina marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y esta toxina sin marca (el analito), pueden unirse a los receptores inmovilizados. Este marcador fluorescente (FITC), cuando se conjuga con la proteína BTX, exhibe máximos de absorción y de emisión a 495 nm y 520 nm, respectivamente. En ausencia del analito (BTX sin marca), una cantidad máxima de FITC-BTX se une a los receptores inmovilizados.

El transductor de fibra óptica explota la reflexión interna total para actuar como guía de ondas con una pérdida mínima de intensidad de luz entre los extremos de la fibra. Tales sistemas de reflexión interna totales exhiben una onda evanescente en el límite entre la solución y el cuarzo, a lo largo de la longitud de la fibra, que penetra el medio circundante a una distancia de alrededor de la mitad de la longitud de onda de excitación. La onda evanescente permite la excitación del FITC unido a la fibra cerca de la superficie de cuarzo, y permite la captura de la luz emitida por el FITC a 520 nm, según se muestra en la Figura 7.6.

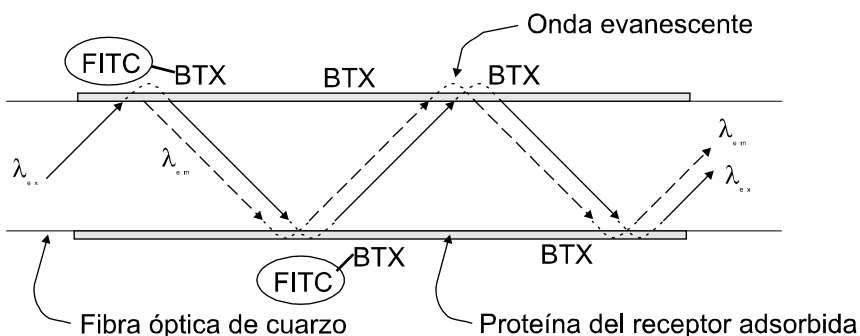


Figura 7.6. Principios de funcionamiento para el biosensor de BTX basado en fluorescencia de onda evanescente.

De igual manera que en inmunoensayos competitivos, la competencia entre BTX y BTX marcado con FITC resulta en un cambio en la señal -en este caso, la intensidad de la

luz emitida a 520 nm disminuye el aumento de la concentración de BTX. Cualquier analito que pueda unirse al sitio de unión del BTX en el receptor de acetilcolina desplazará al BTX marcado, y por lo tanto causará una disminución de la señal. La Figura 7.7 muestra las curvas obtenidas para tres analitos: BTX, tubocurarina, y carbamilcolina. La curva obtenida para la acetilcolina se encuentra entre las obtenidas para la carbamilcolina y la tubocurarina. Debido a que la reacción de unión del FITC-BTX con el receptor es esencialmente irreversible, un método cinético se utiliza para determinar la magnitud de la señal. El cambio en intensidad de la fluorescencia con el tiempo es registrado por varios minutos, para las soluciones de FITC-BTX solamente, y para las soluciones que contienen FITC-BTX y dada concentración de un analito. En la presencia del analito, el aumento de la fluorescencia con el tiempo es menor que en ausencia del analito. La naturaleza irreversible de la reacción hace necesario la limpieza de la superficie de la fibra y la reabsorción de nuevas moléculas del receptor entre mediciones, por ello no se considera a este sensor ni reusable ni apto para uso continuo.

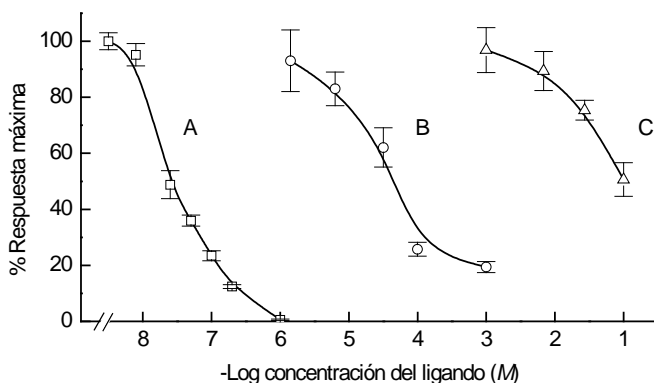


Figura 7.7. Curvas de calibración de la respuesta de fluorescencia relativa versus el logaritmo de la concentración para tres analitos en el sensor fibra óptica/AChR/FITC-BTX: (A) BTX; (B) tubocurarina; y (C) carbamilcolina. Reproducido con permiso, de K.R. Rogers, J.J. Valdes y M.E. Eldefrawi, *Analytical Biochemistry* **182**, 1989, 353-359. "Acetylcholine Receptor Fiber-Optic Evanescent Fluorosensor". Copyright © 1989 by Academic Press, Inc.

7.3.5 Biosensor óptico para glucosa basado en transferencia de energía de fluorescencia⁹

Este sensor para glucosa se basa en macromoléculas atrapadas en un extremo (el extremo distal) de una fibra óptica para la generación de la señal. Las macromoléculas, dextrano marcado con FITC y concavalina A marcada con rodamina (Rh-ConA), son atrapadas por

9. D. Meadows y J.S. Schultz, *Talanta* **35**, 1988, 145-150.

una fibra de diálisis hueca que encaja perfectamente sobre el extremo de la fibra óptica, según puede verse en la Figura 7.8A. Se establece un equilibrio competitivo entre la glucosa y el dextrano marcado con FITC, ya que ambos se pueden unir a la Rh-ConA:

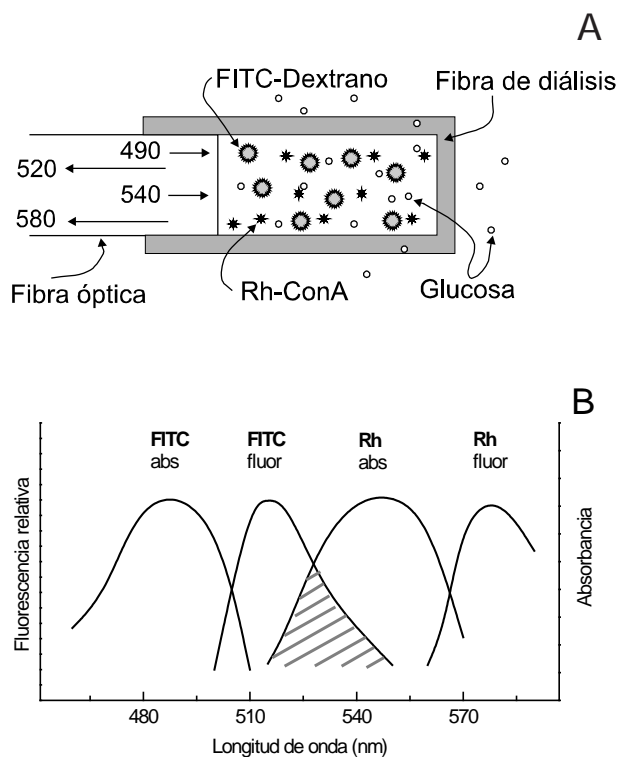
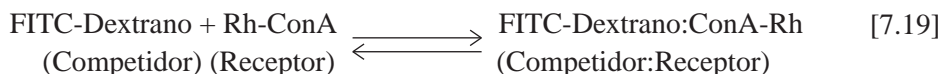
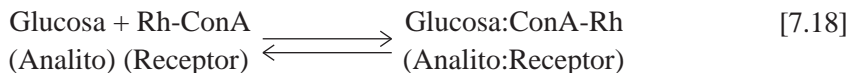


Figura 7.8. (A) Biosensor para glucosa; (B) propiedades espectrales del FITC y Rh. Reproducido con permiso, de D. Meadows y J.S. Schultz, *Talanta* **35** (Nº 2), 1988, 145-150. "Fiber-Optic Biosensors Based on Fluorescence Energy Transfer". Copyright © 1988 Pergamon Journals Ltd.

FITC se excita a 490 nm, y emite fluorescentemente a 520 nm. La rodamina tiene un máximo de absorción a 540 nm, y emite a 580 nm. La Figura 7.8B muestra la zona en la que espectro de emisión del FITC y el espectro de absorción de la rodamina se superponen.

La intensidad de la emisión del FITC se mide a 520 nm como la señal analítica. Cuando el dextrano marcado con FITC está unido a la Rh-ConA, la marca de rodamina apaga la emisión de 520 nm, de modo que la intensidad medida se encuentra en un mínimo. En la presencia del analito (glucosa) que difunde a través de la fibra de diálisis en la extremidad de la fibra óptica, el FITC-dextrano es desplazado de la Rh-ConA por la glucosa, y por ello la intensidad de la emisión a 520 nm aumenta. Este sensor permite la cuantificación de la glucosa en concentraciones de hasta 5 mM, y tiene una respuesta relativamente lenta debido al tiempo requerido para que se establezca el equilibrio de las reacciones macromoleculares.

7.3.6 Sensor piezoeléctrico para la detección de ácidos nucleicos¹⁰

Este dispositivo emplea el ácido poli-adenilico de cadena simple (poli(A)) como el agente químico de reconocimiento. Esta especie reconoce selectivamente su polímero complementario, poli(U), con el que mediante hibridación forma un ácido nucleico de cadena doble. El poli(A) se inmoviliza sobre la superficie activada de un cristal piezoeléctrico de cuarzo, que es un transductor sensible a la masa. En los materiales anisotrópicos (tales como los cristales de cuarzo) sometidos a stress o tensión mecánica se generan dipolos eléctricos; de la misma manera, en presencia de un campo eléctrico, estos materiales experimentan cambios dimensionales, u oscilaciones. La frecuencia de la oscilación está en el orden de los MHz (10⁶ Hz). Esta frecuencia resonante disminuye si se agrega masa a la superficie del cristal; de hecho, se ha demostrado que la frecuencia de la resonancia es inversamente proporcional a la masa superficial. Estos transductores son sensibles a la humedad, por ello las medidas deben realizarse en un ambiente seco o bien en condiciones de humedad controlada y reproducible; las mediciones *in situ* no son posibles debido al amortiguamiento (damping) de las vibraciones por la viscosidad del medio.

El sensor de ácidos nucleicos fue preparado de la siguiente manera; primero se derivatizó la superficie del cuarzo con un copolímero del estireno y ácido acrílico en una relación 3:1. Luego la poli(A) fue covalentemente inmovilizada sobre los grupos libres del ácido carboxílico mediante la formación de un enlace amida con los grupos amino en la base de la adenina. La hibridación ocurrió durante la incubación con el poli(U). Después de cada uno de los tres pasos, el sensor fue lavado y secado, luego la frecuencia resonante de oscilación fue medida. Antes de cualquier tratamiento, los cristales del cuarzo exhibieron una frecuencia resonante de 9 MHz. Debido a que cada paso del tratamiento de la superficie implicó la adición de masa a la superficie cristalina, se espera una disminución de la frecuencia después de cada paso. La Figura 7.9 muestra los cambios reales de la frecuencia que se midieron utilizando un sensor preparado según lo descrito arriba, así como de un sensor preparado sin la poli(A), en el que no puede producirse hibridación alguna (es decir, un sensor de control).

10. N.C. Fawcett, J.A. Evans, L.-C. Chien y N. Flowers, *Anal. Lett.* **21**, 1988, 1099-1114.

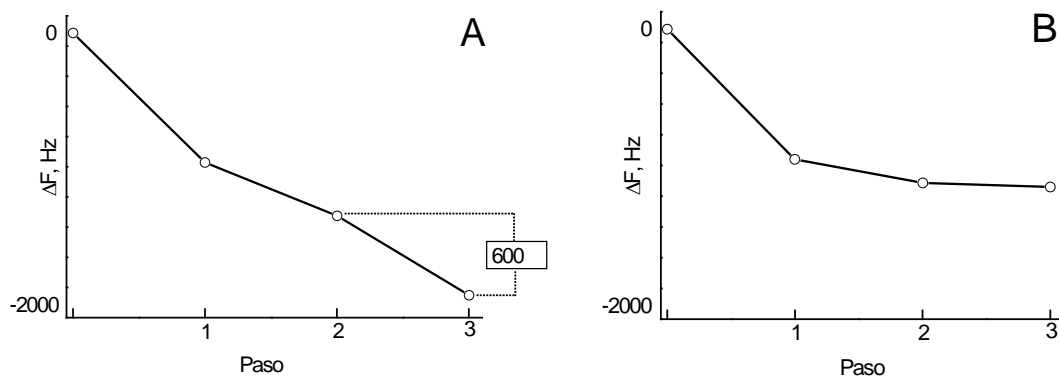


Figura 7.9. Cambios en la frecuencia resonante de oscilación para un transductor piezoeléctrico (A) con, y (B) sin poli-A inmovilizada sobre la superficie del transductor. Paso 1 es la modificación de la superficie con un copolímero, Paso 2 es la inmovilización de poli-A y Paso 3 es la hibridación de la molécula complementaria, poli-U.¹⁰ Reproducido con permiso, de N.C. Fawcett, J.A. Evans, L.-C. Chien y N. Flowers, *Anal. Lett.* **21**, 1988, 1099-1114. “Nucleic Acid Hybridization Detected by Piezoelectric Resonance”.

Copyright © 1988 by Marcel Dekker, Inc.

Aunque este sensor empleó solamente como modelo de elemento de reconocimiento una cadena de ácido nucleico (poli(A)), demuestra el principio de detección de una secuencia complementaria, la cadena de poli(U), el analito en este experimento. En la Figura 7.9A se observa una disminución de la frecuencia de 600 Hz después del paso de hibridación, paso 3, y que esta disminución no fue observada en un sensor de control que no posee poli(A) sobre su superficie. El sensor exhibe un cambio relativamente pequeño de frecuencia, que se encuentra superpuesto al elevado valor de frecuencia de resonancia inicial (9 MHz), por ello la relación señal a ruido (S/N) es baja; además, las dificultades asociadas a medidas *ex situ* así como los requerimientos de humedad constante dificultan que este dispositivo sea utilizado en la práctica para la detección de DNA o de RNA.

7.3.7 Termistores enzimáticos¹¹

Una variedad de biosensores enzimáticos han sido ensayados usando termistores como transductores de la señal. Los termistores son similares a otros los resistores eléctricos, pero sus valores de resistencia son altamente dependientes de la temperatura. Puesto que muchas

11. B. Danielsson y F. Winquist in “*Biosensors: A Practical Approach*”, A.E.G. Cass, Ed., Oxford University Press, New York, 1990. pp. 191-209.

VII. BIOSENSORES

reacciones enzimáticas son acompañadas por cambios significativos de la entalpía, los termistores en los que se han inmovilizado enzimas pueden detectar los pequeños cambios de temperatura en el ambiente cercano a la superficie del termistor, directamente relacionados con la reacción enzimática. Por ejemplo, las reacciones catalizadas por la catalasa, la glucosa oxidasa y la NADH deshidrogenasa son acompañadas por cambios de la entalpía de -100, -80 y -225 kJ/mol, respectivamente.

La Figura 7.10 muestra un diagrama esquemático de un termistor enzimático usado para ensayar una variedad de enzimas inmovilizadas en un dispositivo biosensor en un sistema de inyección en flujo (FIA). Los sensores de temperatura están ubicado dentro de la cámara de reacción, la que esta rodeada por una camisa termostatazada, de aluminio (para evitar las respuestas debido a las fluctuaciones ambientales de la temperatura). El puente de Wheatstone permite la medida diferencial de ambos termistores, permitiendo así la medición de los pequeños cambios de temperatura (del orden de los 10^{-4} °C).

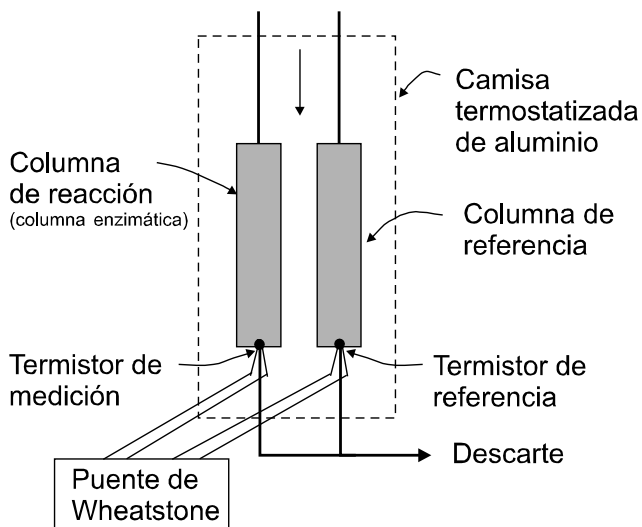


Figura 7.10. Termistor enzimático, en una configuración típica de flujo dividido (split-flow) con una camisa de temperatura constante, de aluminio.

Usando dispositivos similares al mostrado en la Figura 7.10, muchas enzimas inmovilizadas han sido ensayadas. La Tabla 7.1 resume los analitos, las enzimas, y los rangos dinámicos en que los termistores enzimáticos son útiles para la cuantificación del sustrato.

Analito	Enzima (s) inmovilizadas	Rango de concentración, mM
Acido ascórbico	Ascorbato oxidasa	0,05 - 0,6
ATP	Apirasa	1 - 8
Celobiosa	β -Glucosidasa + glucosa oxidasa/catalasa	0,05 - 5
Cefalosporina	Cefalosporinasa	0,005 - 10
Colesterol	Colesterol oxidasa + catalasa	0,03 - 0,15
Creatinina	Creatinina iminohidrolasa	0,01 - 10
Etanol	Alcohol oxidasa/catalasa	0,01 - 2
Galactosa	Galactosa oxidasa	0,01 - 1
Glucosa	Glucosa oxidasa/catalasa	0,001 - 0,8
Glucosa	Hexoquinasa	0,5 - 25
Lactato	Lactato-2-monooxigenasa	0,005 - 2
Lactato	Lactato oxidasa/catalasa	0,002 - 1
Lactosa	β -Galactosidasa + glucosa oxidasa/catalasa	0,05 - 10
Acido oxálico	Oxalato oxidasa	0,005 - 0,5
Acido oxálico	Oxalato descarboxilasa	0,1 - 3
Penicilina	β -Lactamasa	0,01 - 500

Tabla 7.1. Biosensores basados en transductores de temperatura.¹¹ Reproducido con permiso, de B. Danielsson and F. Winquist in “*Biosensors: A Practical Approach*”, A.E.G. Cass, Ed., Oxford University Press, New York, 1990. “The Practical Approach Series, Edited by D. Rickwood and B.D. James. © Oxford University Press 1990.

7.4 Evaluación del funcionamiento de los biosensores

Además de los parámetros generalmente utilizados para la evaluación para los métodos analíticos (Capítulo 16), la sensibilidad, el límite de detección, el rango dinámico y la precisión, los biosensores también se caracterizan con respecto a su rapidez de respuesta y recuperación. Estas evaluaciones adicionales son un resultado de su uso previsto, para el control rápido y continuo de analitos en muestras de origen biológico, ambiental y, en menor proporción, la industria de los alimentos.

El tiempo de respuesta de un biosensor se ha definido como el tiempo necesario luego de la adición del analito para que la respuesta del sensor alcance el 95% de su valor final. Semejantemente, el tiempo de recuperación se define como el tiempo necesario, después de que el analito ha sido retirado del medio de medición, para que el sensor alcance el 95% de la señal de la línea de base. Los biosensores que poseen tiempos de respuesta y de recuperación en el orden de los diez segundos o menos son apropiados para mediciones *in vivo* o

in situ. Muchos biosensores enzimáticos poseen tiempos de respuesta y de recuperación similares, siendo parámetros como el grosor de la capa de reacción y la concentración de analito los que afectan el tiempo requerido para alcanzar el 95% de los valores finales de las señales. Los biosensores que emplean anticuerpos o quimiorreceptores para el reconocimiento químico muestran a menudo respuestas rápidas, pero presentan el problema de que una cantidad de tiempo excesivo se requiere para que las lecturas retornen a la línea de base (tiempo de recuperación). Esta lentitud es sobre todo un resultado de las elevadas constantes de asociación de estas especies para las moléculas con las que se unen específicamente, con una cinética de asociación muy rápida, y una cinética de disociación que es muy lenta. Los reactivos desnaturalizantes y caotrópicos son a menudo usados *ex situ*, para disminuir la afinidad del agente de reconocimiento para su ligando, interfiriendo con las uniones por puente de hidrógeno o alterando reversiblemente la estructura terciaria de la proteína.

Los biosensores también se evalúan con respecto a su estabilidad. La generación de una señal reproducible para una dada concentración del analito se evalúa con respecto a tiempo de almacenaje, bajo varias condiciones de temperatura y pH, y los resultados indican la *estabilidad del almacenaje* del sensor. La *estabilidad operacional* es un tipo similar de evaluación, realizado bajo condiciones de uso continuo. La estabilidad operacional es generalmente mucho más pobre que estabilidad del almacenaje. Ambos parámetros se informan generalmente como el tiempo requerido para la pérdida de un porcentaje dado de la señal inicial; por ejemplo, el tiempo requerido para que la señal generada por una concentración particular del analito sufra una disminución hasta el 50% de su valor inicial.

El estudio de las interferencias es de importancia particular para los dispositivos destinados para el uso continuo en matrices muy complejas. Los biosensores se prueban no solo para interferencias para las que es esperable que reaccionen o se unan al agente específico utilizado para el reconocimiento químico/bioquímico; el uso final del biosensor se considera, y los componentes de la matriz de la muestra se examinan para determinar su interferencia potencial. Los análisis de prueba se conducen en la matriz de la muestra, y se comparan con los resultados obtenidos en soluciones tampón simples, para determinar la recuperación del analito.

Diferentes pruebas *in vivo* con biosensores implantables para la medición de glucosa se han conducido usando ratas, perros y chimpancés como sujetos de prueba.^{12,13} El objetivo de éstos estudios donde la glucosa se mide en forma continua es el diseño de un páncreas artificial, donde un sensor de glucosa se combina con un mecanismo que permita la dosificación y entrega automática de la dosis adecuada de insulina en pacientes diabéticos. Estos

12. B. Aussedat, V. Thome-Duret, G. Reach, F. Lemmonier, J.C. Klein, Y. Hu y G.S. Wilson, *Biosens. Bioelectron.* **12**, 1997, 1061-1071.

13. J.G. Wagner, D. W. Schmidtke, C.P. Quinn, T.F. Fleming, B. Bernacky y A. Heller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1998, 6379-6382.

y otros estudios han demostrado que las inmunorrespuestas están generadas a menudo hacia los materiales de la membrana y las especies inmovilizadas que se exponen directamente en los tejidos o fluidos de estos mamíferos. Por esta razón, un esfuerzo mundial considerable en la investigación se ha dirigido hacia el desarrollo de materiales biocompatibles para su uso en sensores *in vivo*. En las referencias citadas arriba, poliuretano/polisiloxano¹² y óxido de polietileno¹³ fueron utilizados como las capas externas, biocompatibles, para los estudios *in vivo* a corto plazo.

Hasta la fecha, una variedad significativa de biosensores enzimáticos han sido comercializados y utilizados en laboratorios de análisis clínicos, así como para su uso directo por individuos. Los dispositivos más extensamente disponibles en el mercado son para la medición de glucosa (diabéticos) o de lactato (atletas del alto nivel) en la sangre. Los sensores individuales están siendo incorporando en sistemas que incorporan series de sensores en aparatos que utilizan muy pequeños volúmenes de muestra y reactivos (microfluidic devices), capaces de la medición simultánea de un número de analitos; los ejemplos incluyen sistemas que han utilizado enzimas,¹⁴ anticuerpos¹⁵ y ácidos nucleicos¹⁶ como agentes de reconocimiento con transducción electroquímica¹⁴ u óptica.^{15,16}

7.5 Lecturas sugeridas

- A.P.F. Turner, I. Karube y G.S. Wilson, Eds., “*Biosensors: Fundamentals and Applications*”, Oxford University Press, New York, 1987.
- A.E.G. Cass, Ed., “*Biosensors: A Practical Approach*”, Oxford University Press, New York, 1989.
- A.J. Cunningham, “*Introduction to Bioanalytical Sensors*”, John Wiley & Sons, New York, 1998.
- V.C Yang y T.T. Ngo, Eds., “*Biosensors and their Applications*”, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000.
- R.M. Nakamura, Y. Kasahara y G.A. Rechnitz, Eds., “*Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s*”, American Society for Microbiology, Washington DC, 1992.
- A.M. Campbell, “*Monoclonal Antibodies and Immunosensor Technology*”, Elsevier, New York, 1991.

14. I. Moser, G. Jobst y G.A. Urban, *Biosens. Bioelectron.* **17**, 2002, 297-302.

15. K.E. Sapsford, Z. Liron, Y.S. Shubin y F.S. Ligler, *Anal. Chem.* **73**, 2001, 5518-5524.

16. A.H. Forster, M. Krihak, P.D. Swanson, T.C. Young y D.E. Ackley, *Biosens. Bioelectron.* **16**, 2001, 187-194.

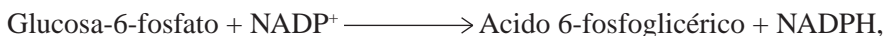
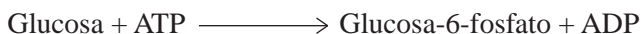
7.6 Problemas

1. Un biosensor para cuantificar glucosa ha sido preparado atrapando una solución 0,50 mM de glucosa oxidasa entre un electrodo amperométrico de carbón, con un área de 0,10 cm² y una membrana de la diálisis, para formar una capa de reacción con un grosor de 0,10 milímetros. El sustrato, glucosa, tiene un coeficiente de difusión cercano a 5×10^{-6} cm²/s, y se ha encontrado que si el sensor se rota a una velocidad constante de 600 rpm, el grosor de la capa de difusión puede ser asumido igual al de la capa de reacción. En la reacción de la glucosa oxidasa, la velocidad de descomposición del complejo ES, k_2 , es igual a 780 s⁻¹ y el K_m es 50 mM para la glucosa. La eficacia de la colección del electrodo es de 0,45. Se utiliza ferroceno, para regenerar la forma oxidada de la glucosa oxidasa y para entregar electrones en la superficie del electrodo ($n = 2$ moles electrones/mol glucosa), esta muestra una cinética muy rápida para ambos procesos, de modo que la Eq. 7.13 es válida.

- Estime la corriente, en microamperios, que serían obtenidos para una solución 6 mM de glucosa (ésta es la concentración fisiológica normal en sangre entera).
- Estime la corriente que sería obtenida si el grueso de la capa de reacción fuera reducido en un orden de la magnitud (es decir, a 0,010 milímetros).

2. Las descripciones matemáticas de la respuesta de biosensores enzimáticos asumen que concentraciones de estado estacionario de sustratos y de productos existen dentro de la fina capa de reacción en la superficie del transductor, y que las concentraciones en el seno de la solución de estas especies no cambian perceptiblemente con tiempo. Sugiera una situación experimental en la cual no se espere que estas asunciones sean válidas.

3. Las fibras ópticas de poliestireno pueden ser derivatizadas primero nitrando y enseguida reduciendo la superficie para producir grupos aminofenilos. Éstos pueden entonces ser diazotizados para permitir la inmovilización de la proteína a través (principalmente) de residuos de tirosina. Un biosensor de fluorescencia de onda evanescente para la glucosa puede ser diseñado, usando un sistema bienzimático que consiste en hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (ambas tienen un diámetro hidrodinámico < 10 nm), de acuerdo a las siguientes reacciones:



donde el producto de la segunda reacción, NADPH, emite luz fluorescente a 460 nm después de ser excitado a 340 nm. ¿Cuáles de las tres configuraciones siguientes del sensor se pueden

esperar que generen las mayores señales de intensidad de fluorescencia para la misma concentración de glucosa en el seno de la solución sometida a análisis?

- (a) La coadsorpción simultánea de ambas enzimas sobre una superficie de poliestireno sin derivatizar,
- (b) La inmovilización covalente (sin polimerización) de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, seguida por la inmovilización por entrecruzamiento de la hexoquinasa, o
- (c) Coinmovilización de las dos enzimas a través de los residuos de tirosina para formar una monocapa bienzimática en la superficie del poliestireno.

4. ¿Por qué se espera que la estabilidad operacional de un sensor enzimático basado en la detección de cambios térmicos para la detección de ácido oxálico sea más pobre que un sensor amperométrico para oxalato preparado usando la misma enzima, oxalato oxidasa?

CAPITULO 8

EVOLUCIÓN DIRIGIDA PARA EL DISEÑO DE REACTIVOS MACROMOLECULARES PARA BIOENSAYOS

8.1 Introducción

Los reactivos macromoleculares, principalmente enzimas y anticuerpos, se utilizan extensamente en química bioanalítica. Las proteínas usadas como reactivos se obtienen principalmente de fuentes microbianas, vegetales o animales naturales, pero en algunos casos una “cepa industrial” de algún microorganismo, capaz de producir grandes cantidades de la proteína deseada, es seleccionada. La proteína de interés a veces es producida por una cepa bacteriana que no es adecuada para la producción industrial. Para superar este problema, el gen que codifica para la proteína puede ser clonado en una cepa bacteriana apropiada, y la bacteria recombinante que resulta se utiliza como la fuente de la proteína. Ambos métodos permiten la producción de proteínas que son idénticas, por lo menos en su estructura primaria, a la proteína “natural” original.

Desde el origen de la vida hasta el tiempo actual, las enzimas y otras biomoléculas han sido seleccionadas naturalmente por sus capacidades de realizar funciones relevantes en una célula viva. Este lento proceso biológico de la evolución biológica es responsable de cambios moleculares en el diseño de las biomoléculas. La evolución y la adaptación son necesarias para hacer frente a los cambios ambientales y biológicos, a la escala de tiempo geológico, mejorando la aptitud de los fenotipos seleccionados.

La evolución biológica natural ocurre como resultado de mutaciones, de la fragmentación y de la pérdida de sectores del DNA, de duplicación y de otros procesos genéticos. Además, la recombinación sexual aumenta la posibilidad de combinaciones genéticas adecuadas. La selección de variantes mejoradas ocurre como resultado de condiciones ambientales o de presiones de selección.

Las proteínas de origen natural están adaptadas u optimizadas para cumplir su función en condiciones fisicoquímicas específicas. Por ejemplo, las enzimas aisladas de las bacterias encontradas en agua de mar antártica tienen alta actividad a bajas temperaturas, pero se desnaturalizan a una temperatura relativamente baja. Las bacterias termofílicas adaptadas para sobrevivir en el agua de fuentes termales o en los lagos volcánicos poseen enzimas termoestables, que no poseen casi ninguna actividad a baja temperatura. La combinación

de la actividad a bajas temperaturas y de la termoestabilidad en la misma enzima no se encuentra en la naturaleza, porque las biomoléculas naturales no están adaptadas para hacer frente a tales cambios de temperatura extremos. Sin embargo, enzimas que poseen estas dos características han sido diseñadas o se han producido o evolucionado en el laboratorio.

Las macromoléculas biológicas han desarrollado sus estructuras y funciones para las condiciones intracelulares específicas. Las modificaciones post-transduccionales permiten la regulación entre la estructura y función en este ambiente. Por ejemplo, la velocidad de degradación y síntesis de las diferentes enzimas es una de las variables que se pueden controlar para regular los caminos metabólicos celulares que son críticos asegurar la vida. Las biomoléculas adaptadas al ambiente intracelular complejo no poseen generalmente las características ideales para los usos analíticos o industriales, donde el control de la actividad (a través de la modificación estructural) y de la concentración (modificando las velocidades de la biosíntesis y de la degradación) son irrelevantes. Las diferencias en los requisitos para los ambientes intracelulares y analíticos o industriales han creado nuevas oportunidades de investigación para el diseño de biomoléculas no-naturales mediante la modificación genética de sus contrapartes de origen natural.

Las metas para el mejoramiento de enzimas mediante la evolución dirigida de proteínas han sido aumentar estabilidad frente a agentes desnaturizantes (temperatura, pH, solventes orgánicos), mejorar su solubilidad en mezclas de agua-solventes orgánicos, y aumentar la actividad y/o afinidad para el sustrato. Proyectos más ambiciosos también se han emprendido para diseñar enzimas con actividad catalítica para nuevos (pero generalmente relacionados) sustratos.

Las metas para el diseño de nuevos anticuerpos se relacionan con la mejora es su afinidad, la producción de anticuerpos con selectividad de unión hacia otras moléculas, y el diseño de anticuerpos catalíticamente activos. Las ribozimas (ribonucleótidos con actividad catalítica) son también objeto de experimentación utilizando la evolución dirigida; actualmente se están realizando esfuerzos para obtener ribozimas con nuevas actividades catalíticas. Ejemplos de varias moléculas que han sido mejoradas utilizando estas técnicas y de sus nuevas funciones o funciones mejoradas se presentan en la Tabla 8.1.

Biomolécula	Función alterada	Método
Subtilisina E (proteasa)	Actividad aumentada (≈ 170 veces) en solventes orgánicos (60% dimetilformamida)	PCR propensa al error
β -lactamasa (degradación de antibióticos, penicilina y otros)	Actividad hacia un sustrato nuevo (cefotaxima)	Mezclado de DNA
Para-nitrobenzil esterasa	Termoestabilidad e incremento de la actividad (14°C)	PCR propensa al error / Mezclado de DNA
Bifenil dioxigenasas (degradación de bifenilos policlorados)	Mayor actividad hacia sustratos pobremente degradados	Mezclado de DNA de genes homólogos

Proteína verde fluorescente	Colonias bacterianas 40-veces más brillantes	Mezclado de DNA
Dominio variable de la Inmunoglobulina	Tolera la pérdida de un puente disulfuro estructural	PCR propensa al error
Lipasa	Enantioselectividad incrementada en hidrólisis	PCR propensa al error

Tabla 8.1. Algunos ejemplos de biomoléculas mejoradas utilizando evolución dirigida. Los métodos usados para generar diversidad se describen más adelante en este capítulo.

8.2 Diseño racional y evolución dirigida

El diseño racional de proteínas (también llamada ingeniería de proteínas) implica el uso del conocimiento de las relaciones existentes entre estructura y función con el objetivo de diseñar o de mejorar las características de una biomolécula. El diseño racional de una proteína puede lograrse por métodos tales como mutagénesis puntual (site-directed mutagénesis) y la inserción o delección de algunas secuencias del DNA, dando lugar a cambios predecibles en las características de la proteína. Los métodos racionales se han utilizado con éxito para mejorar la estabilidad enzimática a altas temperaturas y hacia otros agentes desnaturizantes físicos o químicos.

Los métodos racionales se basan en evidencia experimental; esta demuestra que el efecto de las substituciones de un único aminoácido en la estabilidad de una proteína puede aproximarse a interacciones independientes, dispersas y aditivas. Por otra parte, mediante la comparación entre enzimas homólogas de microorganismos termofílicos y no-termofílicos, es sabido que la introducción de puentes disulfuro así como el incremento de los residuos de prolina aumentan la estabilidad de la proteína.

Los métodos de diseño racional se han aplicado a la enzima glucosa deshidrogenasa para mejorar la estabilidad termal, la tolerancia al EDTA y la selectividad de sustrato.¹ Enzimas del tipo de las pirroloquinolinas quinonas (PQQ) se encuentran en bacterias Gram-negativas. Esta familia de enzimas utiliza PQQ como el grupo prostético. La PQQ-glucosa deshidrogenasa (PQQGDH) es una enzima monomérica unida a la membrana, con un MW de 84 kD. Una versión mejorada de esta enzima sería muy útil en sensores de glucosa; la enzima usada comúnmente en estos dispositivos, la glucosa oxidasa, no se puede utilizar bajo condiciones anaerobias a menos que un oxidante esté presente realizar la función del O₂.

Yoshida *et al.* utilizaron la recombinación homóloga de los genes que codifica para las PQQGDH provenientes de *E. coli* y *Acinetobacter calcoaceticus*, así como conocimiento

1. H. Yoshida, K. Kojima, A.B. Witarto y K. Sode. *Protein Eng.* **12**, 1999, 63-70.

previamente adquirido acerca de la relación entre la estructura y función de estas enzimas para generar varias proteínas quimeras. Sus metas eran mejorar la constante de unión al PQQ (ensayada como tolerancia al EDTA, puesto que los iones bivalentes son requeridos para la formación de la holoenzima), aumentar la estabilidad a la temperatura y para mejorar la selectividad de sustrato. El procedimiento empleado se resume esquemáticamente en la Figura 8.1. Siete variantes genéticas fueron producidas a partir del gen original de *E. coli*.

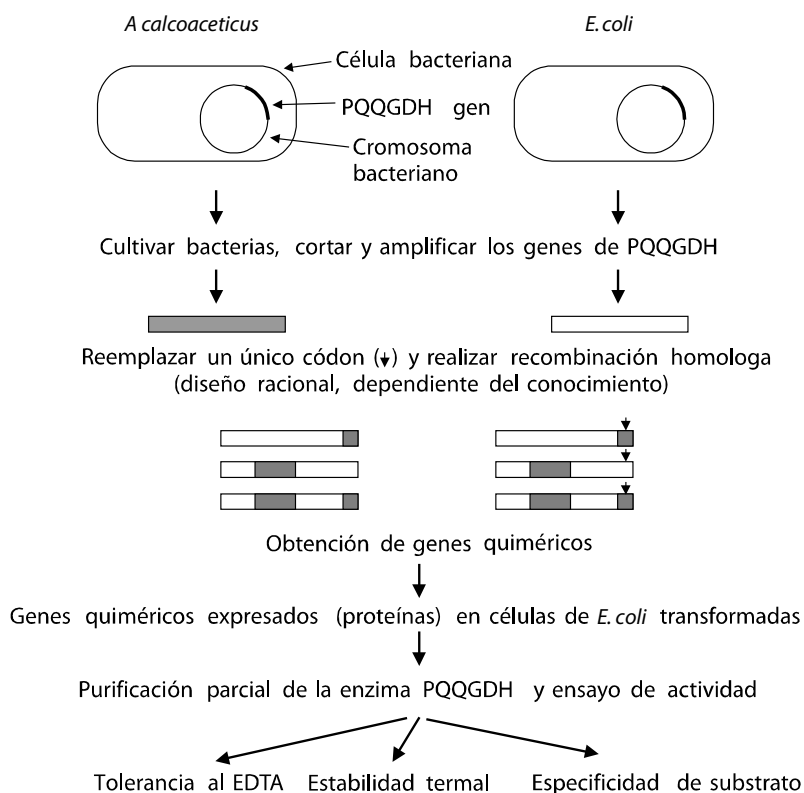


Figura 8.1. Pasos que se siguieron para la construcción (diseño racional) de una enzima mejorada, la PQQGDH.

La mutagénesis dirigida fue utilizada para sustituir el residuo de His en la posición 775 por uno de Asn (His775Asn). Esta mutación mejora la especificidad hacia el sustrato pero causa simultáneamente una disminución en la estabilidad termal. Algunas regiones de *A. calcoaceticus* que son responsables de la resistencia al EDTA y de la estabilidad termal fueron insertadas en el gen de *E. coli* mediante recombinação homóloga.

Los genes quiméricos obtenidos fueron utilizados para transformar las células de *E. coli*, de tal manera de que cada clon exprese solo una variante de la PQQ-glucosa deshidrogenasa. La enzima fue aislada y luego ensayada en una solución tampón que contenía PQQ para formar la holoenzima, así como un indicador colorimétrico. La actividad enzimática fue

probada para diversos sustratos, y el efecto del EDTA y de la estabilidad termal fue investigado. En comparación con la enzima original de *E. coli*, la estabilidad termal de las mejores quimeras fue 8 veces mayor, y la selectividad hacia la glucosa fue mejorada. La tolerancia al EDTA resulto ser tan alta como en la enzima original de *A. calcoaceticus*.

En contraste con los métodos de diseño racionales, donde los cambios en las características de la proteína pueden ser predecidos a partir de los cambios en su secuencia de aminoácidos, los métodos que producen mutaciones al azar han sido introducidos con el objetivo de mejorar empíricamente las características de la proteína, en ausencia de conocimiento *a priori* acerca de las relaciones entre la estructura y la función. La técnica denominada PCR propensa al error, (error-prone PCR), por ejemplo, se puede utilizar para introducir mutaciones aproximadamente al azar en secuencias sometidas a amplificación del DNA. Los productos proteicos de estas mutaciones pueden entonces ser estudiados para seleccionar variantes exitosas o mejoradas.²

La evolución dirigida puede utilizar ambos procedimientos, el diseño racional y métodos de mutación al azar. Generalmente, se reitera un ciclo de tres pasos, hasta que se observan las características deseadas. En el primer paso, se genera la diversidad genética. El segundo paso implica la unión física o química del genotipo (ácido nucleico) al fenotipo (la proteína traducida). En el paso final, se identifican y se seleccionan las variantes exitosas. Un ejemplo de un protocolo típico de evolución dirigida puede observarse en la Figura 8.2.

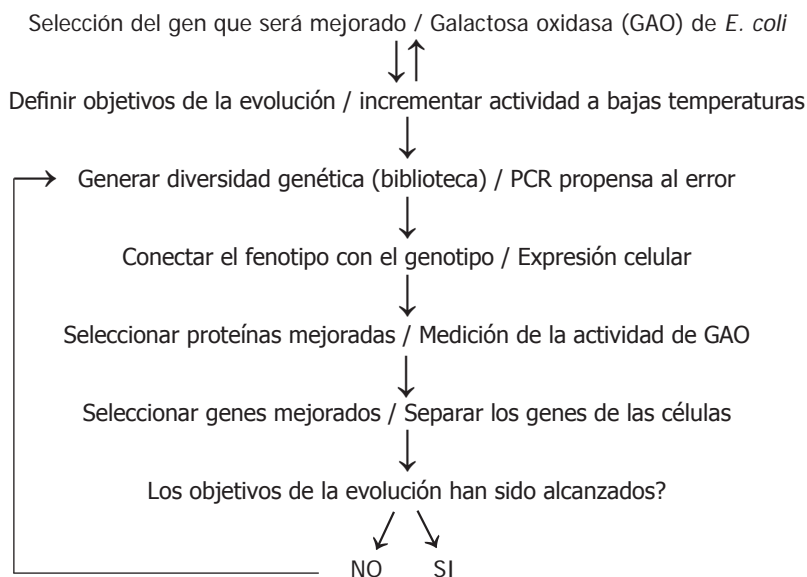


Figura 8.2. Un protocolo simplificado de evolución dirigida; a la derecha se ejemplifica cada uno de los pasos.

2. M.B. Tobin, C. Gustafsson y G.W. Huisman, *Curr. Opin. Structural Biology* **10**, 2000, 421-427.

El número de iteraciones de este ciclo de tres pasos requerido para alcanzar los cambios deseados en las características de la biomolécula depende de dos factores principales. Primero, la llamada “distancia evolutiva” entre la proteína inicial (o el gen inicial) y la molécula final mejorada que desea obtenerse es importante porque se relaciona con el número total y la identidad de las mutaciones requeridas. Este parámetro es a menudo difícil de estimar porque el grado de mejora potencial es generalmente desconocido. El segundo factor es el grado de la diversidad genética generado en el primer paso del ciclo; si este valor es alto, pocos ciclos se deberían requerir para obtener las características deseadas. Varios autores han informado que han tenido éxito utilizando solamente 2-3 ciclos, causando 3-4 sustituciones puntuales de aminoácidos en las enzimas evolucionadas.^{3,4}

8.3 Generación de la diversidad genética

La generación de una biblioteca genética grande (o repertorio) puede ser lograda mas o menos fácilmente por métodos tales como la PCR propensa al error y mediante el “mezclado de DNA” (DNA shuffling), según se describirá mas adelante. Los estudios teóricos han modelado la probabilidad, P, de que un ligando o epítopo dado sea reconocido por al menos un anticuerpo en un repertorio, o población genéticamente diversa de anticuerpos. En este modelo, P depende del tamaño del repertorio (N_{ab}) y del valor umbral deseado para la constante de disociación K_d (o más específicamente del pK_d). P es la probabilidad que un anticuerpo reconocerá cualquier epítopo dado con una afinidad por lo menos igual a K_d .

$$P = 100 \times (1 - e^{-N_{ab}(pK_d)})$$

Se tiene entonces la relación que existe entre el tamaño del repertorio y un repertorio completo, y se demuestra que al menos 10^8 - 10^{10} anticuerpos distintos son necesarios en el repertorio si el umbral requerido para el K_d es de 10^{-8} - 10^{-10} , dependiendo de la probabilidad seleccionada (Figura 8.3).³ Por lo tanto, para una secuencia inicial, el primer paso en el ciclo de evolución dirigida debe ser capaz de generar unas 10^8 - 10^{10} secuencias del ácido nucleico, que codifiquen para diversas proteínas. Éste es el tamaño de la biblioteca o de repertorio necesario para la evolución dirigida según este modelo. Sin embargo, se han obtenido buenos resultados experimentalmente (principalmente con enzimas) utilizando como punto de partida bibliotecas más pequeñas, de cerca de 10^4 miembros.^{5,6}

3. W.P. Stemmer, *Nature* **370**, 1994, 389-391.

4. L. You, F.H. Arnold, *Protein Eng.* **9**, 1996, 77-83.

5. O. May, P.T. Nguyen y F.H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **18**, 2000, 317-320.

6. F.C. Christians, L. Scapozza, A. Cramer, G. Folkers y P.C. Stemmer, *Nat. Biotechnol.* **17**, 1999, 259-264.

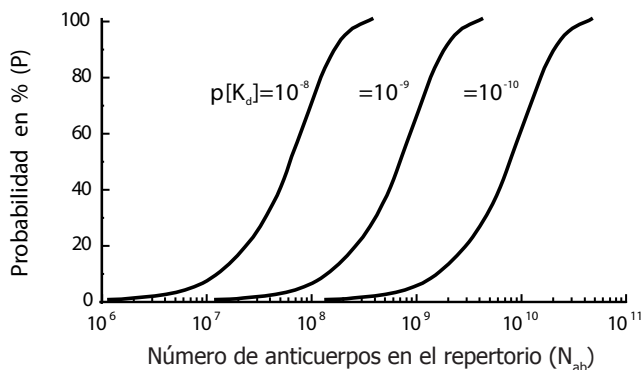


Figura 8.3. La probabilidad de encontrar por lo menos un anticuerpo que reconozca cualquier epítipo dado en función de tamaño del repertorio y del valor K_d del umbral.⁷ Reproducido, con permiso, de A.D. Griffiths y D.S. Tawfik, *Current Opinion in Biotechnology* **2**, 2000, 338-353. “Man-Made Enzymes - From Design to In Vitro Compartmentalization”. © 2000 Elsevier Science Ltd.

Aunque trabajos tempranos en esta área han utilizado métodos puramente físicos o químicos para producir mutagénesis, actualmente se utilizan principalmente dos métodos para la generación de diversidad: La *PCR propensa al error* (*error-prone PCR*), una modificación de la reacción en cadena de la polimerasa y la denominada de *mezclado del DNA* (*DNA shuffling*). Ambas técnicas requieren la selección inicial y el aislamiento del gen o de los genes del interés. Las enzimas de restricción (endonucleasas) se pueden utilizar para cortar el gen o los genes seleccionado/s del material genético cromosómico; luego de esto, se procede con pasos de purificación y eventualmente la amplificación. A menudo el gen utilizado para comenzar el proceso de evolución dirigida se aísla del mRNA correspondiente, y la enzima transcriptasa reversa se utiliza para obtener la cadena de DNA complementaria correspondiente (cDNA).⁸

8.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa y PCR propensa al error

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza normalmente para aumentar la concentración de una secuencia dada de DNA, previamente a su análisis. Para este uso primario, las concentraciones de los reactivos y otras condiciones se controlan cuidadosamente para evitar la introducción de errores (mutaciones) durante el proceso de copiado.

En esta reacción, se utiliza una secuencia de la DNA (templado) de hasta unas 10.000 bases. La DNA polimerasa de una bacteria termofílica es utilizada. Por ejemplo la Taq-polimerasa (proveniente de *Thermus aquaticus*) es utilizada para catalizar la extensión de dos “primers”

7. A.D. Griffiths y D.S. Tawfik, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**, 2000, 338-353.

8. S.R. Bolsover, J.S. Hyams, S. Jones, E.A. Shephard y H.A. White. “*From Genes to Cells*”, Wiley-Liss, New York, 1997, pp 167-178.

mediante la incorporación secuencial de nucleótidos complementarios, según puede observarse en la Figura 10.9 (Capítulo 10). La Taq-polimerasa tiene alta estabilidad termal, conservando su actividad incluso después de muchos ciclos de calentamiento a 95°C. Los primers son secuencias cortas de DNA, de cadena simple, frecuentemente de unas 15 a 25 bases de largo, complementarias a las dos secuencias del extremo 5' de la región de interés del templado de DNA de doble cadena. En esta región la Taq-polimerasa comienza a copiar el templado ampliando los primers en el 3', hasta que el templado es copiado totalmente o el proceso es detenido por un aumento de la temperatura que desnaturalice el DNA. El número de copias obtenidas es igual a $2^n - 1$, donde n es el número de ciclos. El agotamiento del sustrato ocurre normalmente después de 20-30 ciclos, y esto limita de manera práctica el número máximo de ciclos.

La técnica de PCR propensa al error utiliza condiciones alteradas en el medio de reacción para aumentar el índice de producción de errores de copia. La Taq-polimerasa, cuando se utiliza *in vitro*, tiene un índice de error intrínseco muy pequeño, solo un nucleótido no complementario cada 10.000-100.000 bases es insertado en la cadena nascente de DNA (un índice de error de 1 en 10^4 o 10^5). En la Tabla 8.2, se describen las condiciones para aumentar el índice de las mutaciones, donde la tasa de error aumenta al incrementar la concentración de cationes bivalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}) y usando concentraciones iniciales cada vez más desequilibradas de nucleótidos. Observe que la tasa de error puede ser regulada entre 2 y 15 errores para cada 1000 pares de bases, un aumento de una a tres órdenes de magnitud sobre la tasa de mutaciones *in vitro* de la Taq-polimerasa.

Error (%)	[dATP]	[dCTP]	[dGTP]	[dTTP]	[MnCl ₂]	[MgCl ₂]
0,2	0,35	0,4	0,20	1,35	0,5	2,50
0,3	0,20	0,2	0,18	1,26	0,5	2,04
0,4	0,22	0,2	0,27	1,86	0,5	2,75
0,5	0,22	0,2	0,34	2,36	0,5	3,32
0,6	0,23	0,2	0,42	2,90	0,5	3,95
0,8	0,23	0,2	0,57	4,00	0,5	5,20
1,0	0,12	0,1	0,36	2,50	0,5	3,28
1,5	0,12	0,1	0,55	3,85	0,5	4,82

Tabla 8.2. Mutagénesis al azar de fragmentos (del tamaño de un gen) usando PCR propensa al error. Todas las concentraciones están en mM. Un experimento típico se realiza con nanogramos del templado. La [dNTP] se utiliza para calcular la concentración correspondiente del MgCl₂.⁹ Reproducido, con permiso, de M. Fromant, S. Blanquet y P. Plateau, *Analytical Biochemistry* **224**, 1995, 347-353. "Direct Random Mutagenesis of Gene-Sized DNA Fragments Using Polymerase Chain Reaction". Copyright © 1995 by Academic Press, Inc.

9. M. Fromant, S. Blanquet y P. Plateau, *Anal. Biochem.* **224**, 1995, 347-353.

Algunos protocolos generan mutaciones al azar en la cadena de DNA, pero las mutaciones al azar no dan lugar a una incorporación al azar de aminoácidos nuevos en la proteína expresada, que es en definitiva la molécula “blanco” que se pretende mejorar por evolución dirigida. Durante el proceso de la traducción, cada secuencia consecutiva de 3 bases (codón) codifica para un aminoácido o para un codón de terminación (stop), donde la traducción de la proteína se termina. La leucina y la arginina son codificados por 6 diferentes codones, mientras que solamente un codón existe para el triptofano. La mayoría de los otros aminoácidos son codificados por 2 a 4 codones. Las implicaciones de los codones múltiples para realizar una PCR propensa al error no son triviales: las mutaciones al azar de la cadena de DNA producen un sesgo en los cambios de aminoácidos, donde será más alta la probabilidad de la incorporación para los aminoácidos codificados por varios codones, como la leucina y la arginina. Las concentraciones del dNTP en la mezcla de PCR inicial se pueden ajustar para compensar parcialmente para esto, por ejemplo reduciendo la concentración total de dGTP + dCTP.

8.3.2 Mezclado de DNA

En este método utilizado para generar diversidad genética, el gen del interés se corta con DNAsa I en muchos fragmentos cortos, doble cadena (10-50 pares de bases) que después son purificados y recombinados en un proceso del tipo de la PCR pero sin la utilización de primers. Cuando los genes se recombinan parcialmente, se agregan los primers terminales y se amplifican las secuencias integrales. Este proceso se utiliza generalmente después de un paso de PCR propensa al error, donde diversos mutantes del gen son generados. Alternativamente, las condiciones de la PCR propensa al error pueden ajustarse para introducir mutaciones, y evitar entonces la regeneración de la secuencia original.¹⁰ Utilizando una técnica derivada muy efectiva llamada “mezclado de familia” (“family shuffling”), se recombinan genes homólogos provenientes de diversos organismos. La Figura 8.4 muestra una comparación entre las técnicas de mezclado de DNA y la derivada de ella, la de mezcla de familia.

La técnica de mezclado de familia utiliza o mezcla genes que han evolucionado en diferentes especies microbianas, pero que derivan de un gen ancestral, que codifica para una proteína ancestral común a todos ellos, por lo tanto poseyendo secuencias con un alto grado de la identidad. Esto es un requisito para el proceso; es necesaria una identidad de las secuencias mayor al 50%. Enzimas proteolíticas, como la subtilisina han sido “mezcladas”, usando una gran familia formada por 26 secuencias de subtilisina, obteniéndose proteínas quimeras mejoradas, con características que superan perceptiblemente las características

10. B. Steipe en “*Combinatorial Chemistry in Biology*”, M. Famulok, E.-L. Winnacker y C.-H. Wong, Eds., Springer-Verlag, Berlin, 1999, pp. 69-71.

de las mejores variantes parentales.¹¹ Métodos novedosos que mimetizan el proceso de la recombinación sexual también han sido propuestos, y algunos de éstos han sido recientemente revisados.¹²

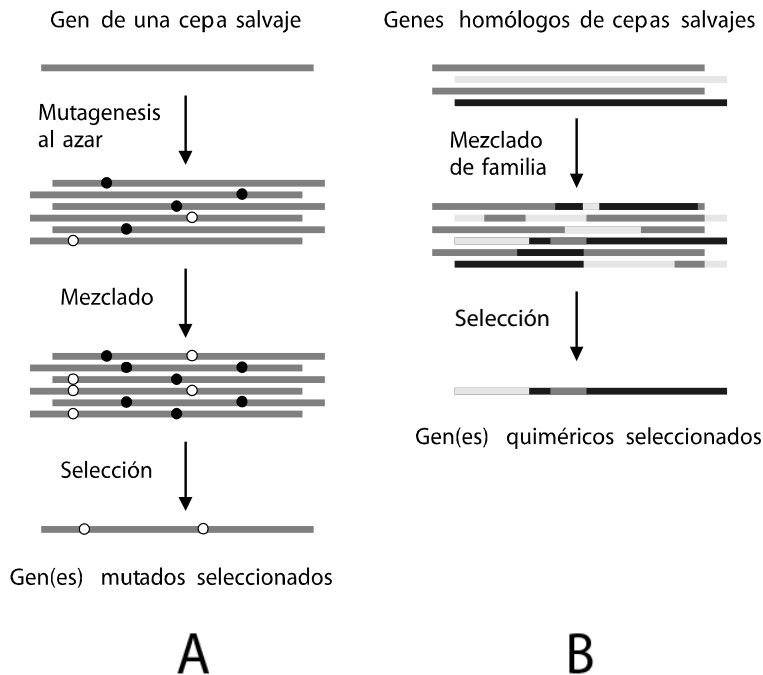


Figura 8.4. Comparación de los métodos de mezclado de DNA -DNA shuffling- (a) y de mezclado de familia -family shuffling- (b). Los puntos blancos y negros representan mutaciones ventajosas y deletéreas, respectivamente.

8.4 Relacionando el genotipo y el fenotipo

Los métodos de evolución dirigida empleados para obtener biomoléculas nuevas o mejoradas son posibles porque las moléculas individuales de ácido nucleico pueden ser “unidas” a la proteína por ella producida. Esta clase de acoplamiento, entre el genotipo y el fenotipo, permite la examinación de las características de la proteína, la selección de los mejores fenotipos, y la utilización del ácido nucleico unido mediante técnicas de transcripción reversa seguida de clonado con el objeto de producir ese genotipo-fenotipo a escala mayor.

11. J.E. Ness, M. Welch, L. Giver, M. Bueno, J.R. Cherry, T.V. Borchert, W.P.C. Stemmer, J. Minshull. *Nat. Biotechnol.* **17**, 1999, 893-896.

12. C. Schmidt-Dannert, *Biochemistry* **40**, 2001, 13125-13136.

Este acoplamiento o relación entre el genotipo y el fenotipo se puede lograr mediante la compartimentarización o bien mediante uniones fuertes, sean estas de naturaleza covalente o no-covalente. Las estrategias que se han desarrollado para generar el acoplamiento y la presentación pueden ser dependientes de la estructura y metabolismo celular (*in vivo*) o bien no dependientes de este (*in vitro*).

Los métodos *in vitro* tienen la ventaja que el tamaño de la biblioteca que se someterá al proceso de selección rápida (screening) puede ser tan grande como 10^{12} - 10^{13} , mientras que el tamaño utilizable mediante la expresión celular (métodos *in vivo*) es de entre 10^8 - 10^{10} diferentes moléculas de DNA. Las proteínas que interfieren o son perjudiciales a los procesos metabólicos de la célula (toxinas, inhibidores de la síntesis proteica, entre otros) no se pueden seleccionar usando métodos *in vivo*.¹³

Los métodos *in vivo* para crear acoplamientos entre el genotipo y el fenotipo están bien establecidos y explotan la maquinaria celular necesaria para sintetizar y procesar algunas proteínas. La presentación en la superficie de la célula de las proteínas (cell surface display) asociado con métodos rápidos para clasificar células (fast cell-sorting systems) puede aumentar el tamaño de la biblioteca que puede ser presentada y seleccionada o sometida a enriquecimiento (screened).

8.4.1 Expresión celular y presentación en la superficie celular (*in vivo*)

En este método, los genes evolucionados se incorporan en un plásmido bacteriano usando técnicas estándares de biología molecular. Los plásmidos, que contienen diversos genes evolucionados se utilizan para transformar distintas células bacterianas; el plásmido se incorpora en el citoplasma bacteriano y su código genético se traduce en proteínas. Las células se plaquean en agar, cada colonia (resultante de una sola célula) se aísla y se vuelven a plaquear. Cada colonia contendrá solo una de las variantes genéticas evolucionadas. La proteína se expresa sin un acoplamiento directo (enlace o unión química) con el plásmido, y puede ser secretada o permanecer en el citoplasma, según se explica en la Figura 8.5. El número de clones que pueden ser sometidos al proceso de selección o enriquecimiento utilizando placas de agar o bien ensayos en medio líquido (usualmente placas multipozo) se limita generalmente a 10^5 clones.

Para superar el número limitado de clones que puede ser estudiado utilizando métodos de expresión en células, se han desarrollado las técnicas de presentación en la superficie celular, en las cuales las copias múltiples de la proteína desarrollada se presentan o exhiben en la superficie de la célula, permitiendo la identificación y la selección rápidas. Los métodos de presentación producen generalmente una conexión física entre el gene y el producto de la proteína, permitiendo el uso de los procesos de selección más bien que de

13. J-M. Zhou, S. Fujita, M. Warashina, T. Baba y K. Taira, *JACS* **124**, 2002, 538-543.

enriquecimiento.¹⁴ Utilizando el método de presentación en la superficie celular, la proteína producida esta físicamente unida a la célula que contiene su respectivo código genético.

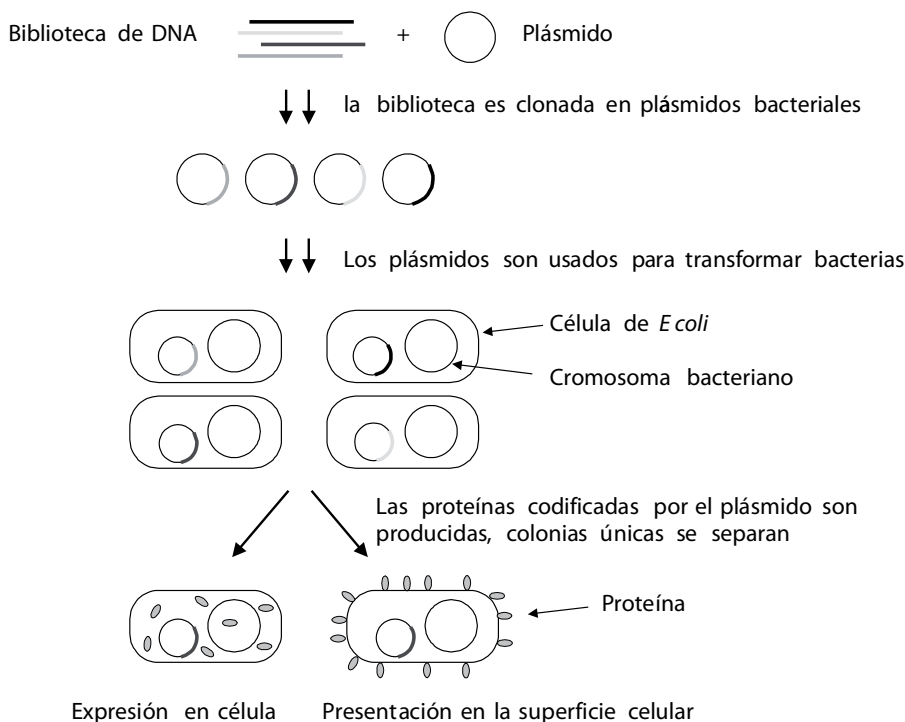


Figura 8.5. Los métodos *in vivo* permiten la conexión entre el fenotipo y el genotipo utilizando la maquinaria celular. Las proteínas sintetizadas permanecen en el citoplasma (o son secretadas) en los métodos que no involucran presentación. Los métodos de presentación en la superficie celular es una técnica más recientemente introducida en la cual se utilizan plásmidos especiales para producir proteínas capaces de ser transportadas y de retenidas por la membrana celular.

8.4.2 Presentación en fago (*in vivo*)

La presentación en fago comienza con la unión de cada miembro de la biblioteca genética a una sección de DNA viral que codifica para alguno de las proteínas de la cápside del virus. El virus posiblemente más comúnmente usado es el fago filamentoso M13, una variedad de uso común en el laboratorio, y la proteína de la cápside es la proteína del gen III, (gIIIp). La población de virus se utiliza para infectar un cultivo bacteriano; los fagos resultantes, descendientes de los utilizados para infectar el cultivo exhiben las proteínas evolucionadas y contienen el código genético responsable de las variantes fenotípicas exhibidas.

14. K. FitzGerald, *Drug Discovery Today* **5**, 2000, 253-258.

Una variación de este método implica la construcción de un plásmido que contiene la variante evolucionada del DNA ligada al DNA del gIIIp. El plásmido se introduce en *E. coli*, y estas bacterias se cultivan; luego el fago M13 es agregado al cultivo. Esta infección es necesaria para permitir la producción de todas las proteínas y otros componentes del fago, fabricados a partir de la maquinaria metabólica celular del anfitrión bacteriano. Cuando los fagos se ensamblan dentro de la célula bacteriana, los cápsides virales exhiben las proteínas evolucionadas en sus superficies, y al mismo tiempo contendrán el gen correspondiente, según se muestra en la Figura 8.6. La presentación en fago se utiliza a menudo cuando se están seleccionando moléculas involucradas en procesos de afinidad molecular (por ejemplo anticuerpos). Una descripción excelente de este sistema de presentación ha sido escrita por Johnsson y Ge.¹⁵

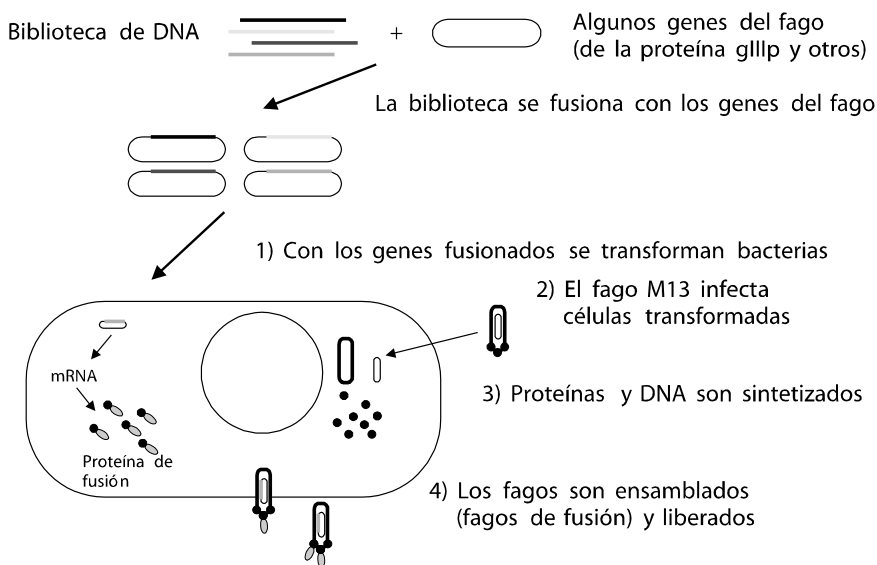


Figura 8.6. Método de presentación en fago. Cuando los fagos son liberados, la unión a los ligandos inmovilizados pueden ser utilizada para seleccionar variantes evolucionadas.

8.4.3 Presentación en ribosoma (*in vitro*)

La presentación en ribosoma utiliza la biblioteca de DNA sin modificaciones, la que se transcribe y se traduce *in vitro*. La vinculación ocurre entre la proteína evolucionada y su mRNA correspondiente; esto se logra evitando que el ribosoma que realiza la traducción pueda separarse del mRNA, ya que este último carece de codón de terminación (stop). Sin

15. K. Johnsson y L. Ge in “*Combinatorial Chemistry in Biology*”, M. Famulok, E.-L. Winnacker y C.-H. Wong, Eds., Springer-Verlag, Berlin, 1999, pp. 87-105.

un codón de terminación, la proteína no es liberada por el ribosoma, y el complejo formado por el mRNA, la proteína (generalmente correctamente plegada) y el ribosoma es utilizado directamente para la selección contra una molécula blanco inmovilizada. Puede observarse un esquema de este método en la Figura 8.7A.

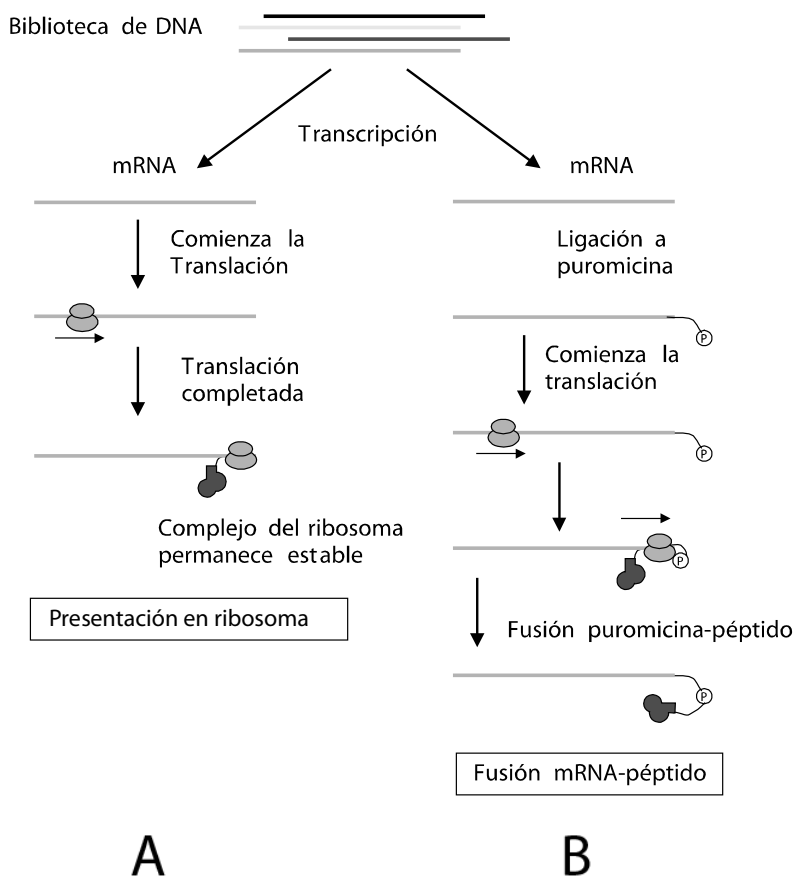


Figura 8.7. La presentación en ribosoma se utiliza para exhibir las moléculas que presentan afinidad por otras; el complejo no-covalente formado (ribosomas, proteína y mRNA) es estabilizado cambiando la composición del medio y bajando la temperatura (A). En la fusión mRNA-péptido el acoplamiento entre el genotipo (mRNA) y el fenotipo (proteína) es covalente (B).

Los complejos seleccionados del mRNA se separan luego del compuesto blanco inmovilizado, y se disocian con EDTA. Usando PCR para realizar la transcripción reversa, y el mRNA purificado como templado, puede obtenerse el DNA correspondiente.¹⁶

16. C. Schaffitzel y A. Plückthun, *TRENDS in Biochemical Sciences* **26**, 2001, 577-579.

8.4.4 Fusión Péptido-mRNA (*in vitro*)

También llamada presentación en mRNA (mRNA display), este método fue derivado de la tecnología de presentación en ribosoma. Se utiliza el mRNA marcado con puromicina y varios pasos adicionales para lograr la unión covalente entre la proteína producida y su mRNA, según puede observarse en la Figura 8.7B. Puromicina, un compuesto utilizado como antibiótico (inhibe la síntesis proteica), con una estructura similar al aminoacil-tRNA, puede ser unido covalente al mRNA por la maquinaria ribosomal.

8.4.5 Microcompartimerización (*in vitro*)

En esta técnica bifásica, la biblioteca de DNA, junto con las enzimas, los cofactores y los monómeros necesarios para los procesos de transcripción y de traducción se encapsulan en una emulsión de agua-aceite. Cada compartimiento acuoso tiene un tamaño similar o aún menor que el de una célula bacteriana (2,6 μm de diámetro), y contiene, en promedio, una sola variante genética. Las ventajas de este método en comparación con métodos de expresión celular incluyen un número más alto de compartimientos útiles por mL de solución, y un sistema de expresión completamente controlable.¹⁷ Una desventaja es la carencia de un acoplamiento directo entre el genotipo y el fenotipo, lo que sería problemático si las condiciones favorecieran la fusión de los microcompartimientos.

8.5 Identificación y selección de las variantes exitosas

Los procedimientos de selección (screening) son definidos generalmente como aquellos que llevan a la identificación de variantes con las características deseadas, mientras que los procedimientos de enriquecimiento (selection) provocan un aumento de las variantes deseadas, obteniéndose como resultado una biblioteca molecular nueva, más pequeña. Cuando se utilizan procedimientos de selección, el tamaño de la biblioteca se limita en la práctica a 10^5 - 10^7 secuencias, puesto que se requiere el análisis de cada variante, mientras que los métodos de enriquecimiento (por ejemplo, mediante purificación con ligandos inmovilizados), se pueden utilizar en bibliotecas mucho más grandes.

Los métodos de selección se basan comúnmente en la detección de un cambio óptico, tal como un aumento de la absorbancia o de la luminiscencia, vía la activación de un gen reportero (reporter gene), tal como el gen de la β -galactosidasa o de la luciferasa. En células

17. A.D. Griffiths y D.S. Tawfik, *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 2000, 338-353.

eucarióticas, el método denominado “de los dos híbridos” ha sido descrito¹⁸; se utiliza para seleccionar en sistemas que involucran interacciones del tipo proteína-proteína. En el método de los dos híbridos, la transcripción de un gen reportero se activa debido a la interacción entre dos proteínas, que reconstituyen un factor de transcripción integrado por dominios de unión al DNA y de activación; los genes reporteros comúnmente usados son LEU2 o HIS3, provenientes de levaduras. Cuando ocurre la interacción proteína-proteína, la transcripción se activa, confiriendo a la célula la capacidad de crecer en medios mínimos (sin leucina o histidina), permitiendo la selección. Algunas técnicas de alta capacidad de procesamiento se basan en cultivos celulares en placas multipozo de alta densidad y muy bajo volumen (6144 pozos con volúmenes de 1-2 μ L o menos).¹⁹

El enriquecimiento se basa en las características funcionales de la proteína evolucionada (fenotipo). La unión al antígeno inmovilizado en los pozos de una placa multipozo o en las superficies de partículas magnéticas son procedimientos frecuentemente usados. Los sistemas de clasificación por citometría de flujo, algunos de los cuales pueden clasificar hasta 10^8 células por hora, representan una nueva y prometedora clase de técnica de enriquecimiento.

8.5.1 Identificación de variantes exitosas por afinidad

Las bibliotecas del gen pueden ser enriquecidas para las variantes exitosas o mejoradas usando una técnica llamada “lavado” (“panning”), en analogía con los sistemas de levigación utilizados para separar el oro del resto del mineral, más liviano, en el cual un ligando unido a la superficie de un material soporte se expone a la mezcla producida, conteniendo las moléculas correspondientes al fenotipo y genotipo unidos. El ligando se puede unir a las superficies de los pozos de una placa multipozo, de partículas magnéticas, membranas o bien en materiales usados como fases estacionarias cromatográficas. En principio, las variantes mejoradas se unirán al ligando fijado al soporte sólido, mientras que las variantes no mejoradas se eliminarán fácilmente durante un paso de lavado.

En la práctica, estos métodos de lavado pueden también seleccionar moléculas con características indeseables. Un problema con el uso de ligandos inmovilizados es que el proceso de la inmovilización puede alterar su estructura y características de unión. Por otra parte, uniones no específicas pueden ocurrir, por ejemplo la adsorción al material soporte. Ambos problemas conducen a la selección de características indeseadas.

18. W. Kolanus en “*Combinatorial Chemistry in Biology*”, M. Famulok, E.-L. Winnacker y C.-H. Wong, Eds., Springer-Verlag, Berlin, 1999, pp. 37-54.

19. G. Georgiou en “*Evolutionary Protein Design*”, F.H. Arnold Ed., Academic Press, San Diego, CA, 2001, pp. 293-311.

Un metodología que puede superar los problemas relacionados con la inmovilización implica el uso del antígeno (o del ligando) covalente unido a biotina (Ag-B). El Ag-B se agrega a la solución en la concentración deseada para permitir la unión en la fase acuosa, para basar el proceso de selección principalmente en la afinidad diferenciada de cada anticuerpo. La mezcla entonces se agrega a las partículas (beads) o a los pozos cubiertos con estreptavidina, donde la formación del complejo no-covalente biotina-estreptavidina permite la selección de las moléculas de antígeno que se unieron con elevada afinidad.

Las enzimas también han sido enriquecidas con éxito de bibliotecas seleccionando las variantes que pueden unirse a los análogos del estado de transición, o por interceptación covalente con sustratos suicidas (inhibidores activados enzimáticamente) inmovilizados sobre alguna superficie,²⁰ pero esta metodología generalmente no selecciona las variantes enzimáticas más activas.

8.5.2 Identificación de las variantes exitosas basadas en actividad catalítica

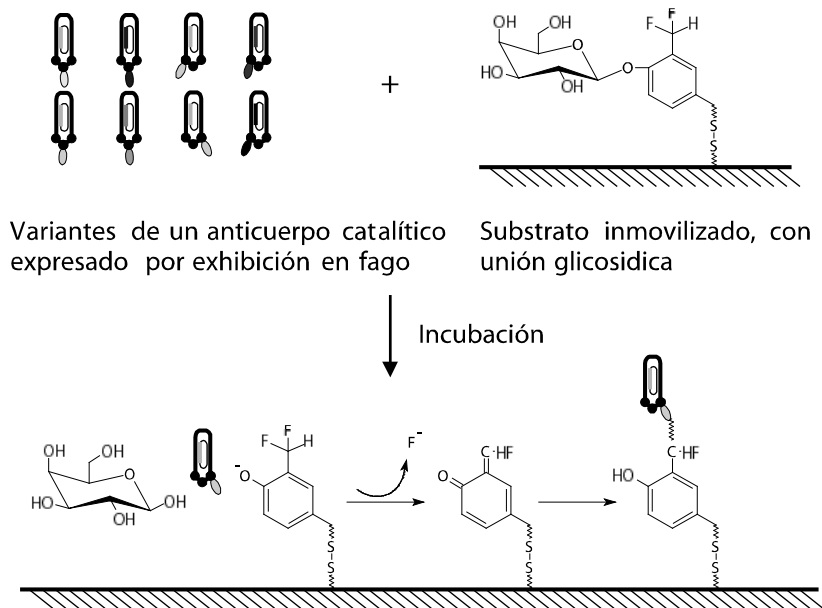
Cuando la actividad catalítica mejorada es la meta del proceso de evolución dirigida, cada variante se ensaya a menudo separadamente (por ejemplo clones bacterianos en pozos de placas multipozo), y ésta implica generalmente la medida de un cambio óptico en cada pozo. Esto permite la investigación de unas 10^2 - 10^6 variantes, y es un método confiable pero que requiere mucho trabajo y tiempo.

Una estrategia que permite el enriquecimiento basado en la actividad catalítica utiliza la medición de un ciclo catalítico único²¹ (single-turnover activity). Los anticuerpos catalíticos capaces de hidrolizar enlaces glucosídicos han sido estudiados usando este procedimiento, según se muestra en la Figura 8.8. En este ejemplo, la reacción del enlace glucosídico con los anticuerpos catalíticos evolucionados, expresados por presentación en fago, da lugar a la producción de una especie altamente reactiva en o cerca del sitio activo de la especie quinona metilo (quinone methide). La reacción con algún nucleófilo próximo (por ejemplo un grupo amino en una proteína) da lugar a la inmovilización covalente del anticuerpo catalítico exhibido por el fago. La inmovilización permite la separación de variantes exitosas de las fracasadas simplemente por lavado con solución tampón, removiendo los fagos que no están unidos covalentemente.

20. P. Forrer, S. Jung y A. Plückthun, *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 1999, 514-520.

21. K.D. Janda, Lee-C. Lo, Chih-H. Lo, Mui-M Sim, R. Wang, Chi-H. Wong y R. Lerner, *Science* **275**, 1997, 945-948.

VIII. EVOLUCIÓN DIRIGIDA PARA...

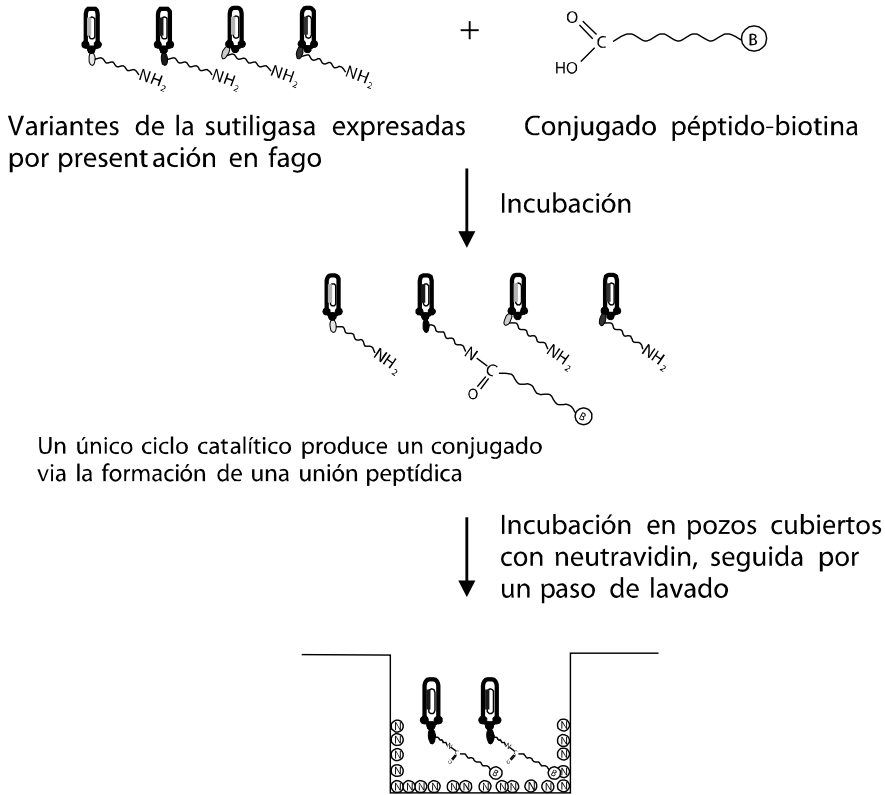


Cuando el grupo glicosídico es hidrolizado, el fago catalíticamente activo es capturado

Figura 8.8. Selección para actividad catalítica mejorada usando un único ciclo catalítico. La mezcla de fagos contiene muchas variantes, y cada fago lleva el DNA que codifica para la proteína evolucionada que se encuentra unida a una proteína de su cápside.²¹ Reproducido, con permiso, de K.D. Janda, Lee-C. Lo, Chih-H. Lo, Mui-M Sim, R. Wang, Chi-H. Wong y R. Lerner, *Science* **275**, Febrero 1997, 945-948. “Chemical Selection for Catalysis in Combinatorial Antibody Libraries”. Copyright © 1997 by AAAS.

Un segundo ejemplo implica diferentes subtiligasas evolucionadas. Las subtilisinas (subtilisinas) son enzimas proteolíticas; las sutiligasas son mutantes que catalizan la unión de péptidos. Las variantes desarrolladas de subtiligasas que ligan péptidos biotinilados sobre su propio extremo N-terminal fueron capturadas selectivamente, según puede observarse en la Figura 8.9. La reacción del sustrato (péptido) marcado con biotina con las variantes evolucionadas de la enzima resulta en un acoplamiento covalente entre el péptido y la enzima. La marca de biotina permite la separación de las variantes exitosas respecto de las fracasadas mediante la utilización de placas multipozo, en las que previamente se ha inmovilizado en las paredes de los pozos neutravidin.²²

22. S. Atwell y J.A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1999, 9497-9502.



Las variantes activas de subtiligasa son capturadas

Figura 8.9. Selección para actividad catalítica mejorada usando un único ciclo catalítico. Neutravidin es una proteína que tiene afinidad por la biotina, de 60.000 daltons, derivada de la avidina, la que ha sido procesada para remover sus carbohidratos y bajar su punto isoeléctrico a 6,3.

Con procesos de selección basados en un único ciclo catalítico, un solo acontecimiento es necesario para la selección; por lo tanto, las variantes seleccionadas no son necesariamente catalizadores mejorados.

8.6 Evolución dirigida de la galactosa oxidasa

La galactosa oxidasa (EC 1.1.3.9, GAO) del hongo *Fusarium sp.* fue utilizada como gen de partida para comenzar un protocolo de evolución dirigida. GAO tiene un peso molecular de 68 kD, y es una glicoproteína monomérica con un 1,7% de carbohidrato; esta formada por 639 residuos aminoácidos, y cataliza la siguiente reacción:



donde el alcohol puede ser glicerol, alcohol alílico, D-galactosa, galactopiranosidos, oligosacáridos y polisacáridos. Esta enzima se ha utilizado en biosensores para medir la D-galactosa y lactosa en muestras de sangre, muestras de la industria láctea y en control de procesos de fermentación. Las metas del experimento de evolución dirigida eran aumentar la estabilidad y actividad de esta enzima hacia algunos sustratos no-naturales.

En un primer paso, el gene de GAO fue aislado de *Fusarium sp.*, y fusionado a un promotor fuerte (*lacZ*). Cuando se induce el promotor, la transcripción por la RNA polimerasa da comienzo, y se producen ambos, mRNA y GAO.

PCR propensa al error fue utilizada para generar diversidad genética, a una tasa de sustitución de 2-3 bases por gene. Los genes transformados fueron clonados en un vector (el plásmido pUC18), y utilizados para transformar células de *E. coli* por electroporación. Las células transformadas fueron plaqueadas en agar, y las colonias (derivadas de una única célula) fueron muestreadas. Luego se cultivaron 12 horas en presencia de IPTG para inducir al promotor *lacZ*, y obtener entonces producción de GAO. Las células después fueron centrifugadas, lavadas y lisadas. La actividad de la galactosa oxidasa fue medida para cada cultivo diferente antes y después de 10 minutos a diversas temperaturas (55-70°C) para determinar estabilidad.

Las variantes mejoradas seleccionadas fueron luego recombinadas usando un método similar al mezclado de DNA. Tres o cuatro rondas de mutación permitieron la selección de una enzima mutante con una actividad 15 veces más alta, y el aumento de aproximadamente 5°C en la estabilidad. La selectividad hacia el sustrato no presentó cambios con respecto al la enzima de la cepa salvaje de *Fusarium*.²³ Este es un ejemplo de los muchos usos posibles de la evolución dirigida para la generación de nuevos reactivos con nuevas o mejoradas características, con aplicaciones en el área de los bioensayos, biosensores y otras.

8.7 Lecturas sugeridas

M. Famulok, E.-L. Winnacker y C.-H. Wong, Eds., “*Combinatorial Chemistry in Biology*”, Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 243, Spriger-Verlag, Berlin, 1999.

F.H. Arnold Ed., “*Evolutionary Protein Design*”, Advances in Protein Chemistry Vol. 55, Academic Press, San Diego, CA, 2001.

23. L. Sun, I.P. Petrounia, M. Yagasaki, G. Bandara y F.H. Arnold, *Protein Eng.* **14**, 2001, 699-704.

8.8 Problemas

1. ¿Considera que la siguiente declaración es verdadera o falsa? Porque?. “La evolución biológica ha optimizado los sistemas biológicos durante los últimos 4 mil millones de años; por lo tanto, no hay posibilidades de mejorar u optimizar las características de las enzimas”.

2. ¿Cuál es el criterio principal usado para decidir entre un protocolo de evolución dirigida o un diseño racional? Proponga otros criterios que se podrían utilizar para apoyar una decisión.

3. Cuando se utiliza la PCR propensa al error para generar diversidad, la magnitud del error se ajusta generalmente en valores de entre 2 y 15 errores cada 1000 pares de bases. ¿Cuál sería el resultado de un experimento de este tipo para generar diversidad, si la magnitud del error fuera ajustada a 2 errores cada 25.000 pares de bases? ¿Y si se ajusta a 2 errores para cada 10 pares de bases?

4. ¿Por qué los procedimientos de PCR se limitan a 20-30 ciclos? Complete la tabla siguiente (Tabla 8.3) para comprobar su respuesta. 5 ng de templado (DNA) se utilizan, con MW = 448.500. Asuma que el templado entero es copiado en cada ciclo.

Número de ciclos	Número de copias de DNA. (Para cada molécula del templado)	Masa de DNA en gramos
5		
15		
30		
60		
500		

CAPÍTULO 9

PRINCIPIOS DE ELECTROFORESIS

9.1 Introducción

La electroforesis es una herramienta bioanalítica usada tanto en investigación básica como en los protocolos para el diagnóstico y/o el aislamiento y la identificación de biomoléculas de alto peso molecular. La separación se basa en la movilidad diferencial de macromoléculas cargadas bajo influencia de un campo eléctrico. La movilidad es una característica fundamental de una macromolécula, y su valor depende de la magnitud de su carga, de su peso molecular, y de su estructura terciaria o cuaternaria (es decir, su forma). Debido a que la mayoría de los biopolímeros, tales como proteínas y ácidos nucleicos, poseen carga, pueden ser separados y cuantificados por métodos electroforéticos.

Las separaciones electroforéticas ocurren en solución acuosa, generalmente embebida en un material soporte sólido o semisólido; en ambos extremos se disponen sendos electrodos. En uno de los extremos se encuentra el *ánodo*, cargado positivamente, y en el otro está el *cátodo*, negativamente cargado, según puede observarse en la Figura 9.1. El medio soporte puede ser tan corto como 10 centímetros o tan largo como 1 metro. A través de este medio, las especies cargadas positivamente migrarán hacia el cátodo y las especies negativamente cargadas se moverán hacia el ánodo.

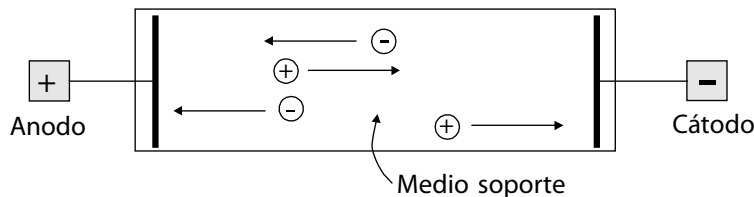


Figura 9.1. Movimiento de especies cargadas en electroforesis.

El medio líquido, generalmente una solución tampón, que se encuentra embebido en un material sólido inerte tal como papel o bien en un gel semisólido, permite el movimiento de iones, mientras que el soporte sólido cumple diferentes funciones, evitando los movimientos convectivos de la solución y frenando a las moléculas mayores. Cuando un voltaje se aplica a

través de los electrodos, una corriente se genera debido al movimiento de iones en el campo eléctrico. La fuerza del campo eléctrico, E , determina la velocidad de la migración de la especie en el soporte y se puede variar experimentalmente.

$$E = (\text{voltaje aplicado}) / (\text{longitud del medio soporte}) \quad [9.1]$$

La electroforesis a baja tensión se realiza típicamente en campos eléctricos de unos 20 V/cm, mientras que en las técnicas de alto voltaje campos eléctricos de hasta 200 V/cm. son empleados.¹

En tales altas fuerzas de campo y voltajes aplicados, es razonable preguntar por qué los procesos redox no son importantes en electroforesis, puesto que las reacciones electroquímicas se sabe que ocurren inclusive cuando el voltaje aplicado es menor a 5 voltios. La Figura 9.2 muestra que la diferencia fundamental entre la electrólisis y la electroforesis, representada como simples circuitos eléctricos. La electrólisis ocurre cuando el medio que separa los dos electrodos posee una alta conductividad intrínseca, de modo que las interfaces entre los electrodos y la solución se comporten como condensadores, y éstos son conectados (idealmente) sin ofrecer resistencia a la corriente. La diferencia de potencial es aplicada través de estos condensadores, y las enormes fuerzas del campo generadas en los pocos nanómetros de las interfaces del electrodo-solución generan la reacción electroquímica que, en el modelo del circuito, descargan los condensadores.

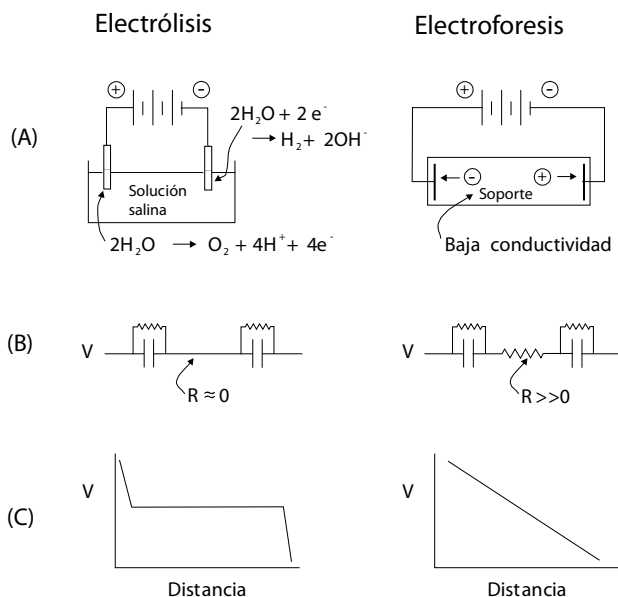


Figura 9.2. Disposición experimental (A), circuito eléctrico equivalente (B) y dependencia del potencial respecto de la distancia entre los electrodos (C) para la electrólisis y la electroforesis.

1. H. Michl en "Chromatography. A Laboratory Handbook of Chromatographic and Electrophoretic Methods", 3rd Ed., E. Heftmann Ed., Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1975, pp. 282-311.

Por otra parte, los medios utilizados en electroforesis tienen conductividad mucho más baja, por lo que un circuito equivalente para una celda de electroforesis incluye un resistor entre los condensadores en la interfase entre el electrodo y la solución. A través del medio soporte, el potencial ahora es (idealmente) una función lineal de la distancia, y el campo eléctrico así generado es el responsable de producir la separación electroforética. En los electrodos usados para realizar la electroforesis, ocurre también electrolisis, manteniéndose la corriente a través del medio soporte; sin embargo, el voltaje requerido para generar esta corriente (<5V) es insignificante respecto al mayor potencial aplicado.

La descripción teórica del proceso de migración electroforética² comienza con la consideración de una partícula con carga q suspendida en un medio aislante, y expuesta a un campo eléctrico E . Las leyes fundamentales de la física establecen que la fuerza eléctrica ejercida sobre la partícula será igual al frenamiento debido a la viscosidad, según se observa en la Eq. 9.2:

$$qE = f v, \quad [9.2]$$

donde f es coeficiente friccional, y v es la velocidad de la partícula. El producto $f v$ es la fricción viscosa ejercida por el medio sobre la partícula. En el vacío, el coeficiente friccional es cero, y la velocidad se eleva a infinito. En un medio soporte electroforético, el coeficiente friccional es significativo, y una velocidad característica es alcanzada por las partículas cargadas mientras que migran a través del soporte.

Para compensar por las variaciones experimentales en E , la movilidad electroforética de una partícula se ha definido como una característica propia de una molécula bajo condiciones dadas del medio soporte, pH, fuerza iónica y temperatura. La movilidad electroforética, μ , se informa generalmente en unidades de velocidad por unidad de fuerza del campo, y esta dada por la Eq. 9.3:

$$\mu = v/E = q/f. \quad [9.3]$$

El valor de μ es una característica de una macromolécula dada, y ha sido demostrado que depende de su peso molecular y de su forma (relacionados con el coeficiente friccional f), y con su carga neta q . Esta ecuación simple predice correctamente que la movilidad aumenta con q , disminuye con el aumento de f , y es igual a cero para las partículas sin carga.

Tentativas para aplicar rigurosamente la Eq. 9.3 a los datos experimentales han revelado un número de complicaciones que no son consideradas por esta simple ecuación. Los medios soporte usados en electroforesis no son estrictamente aisladores, y contienen generalmente iones de la solución tampón; las especies cargadas en esta solución atraerán los iones, lo que

2. B.S. Dunbar, "Two-Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques", Plenum Press, New York, 1987. pp. 4-5.

da lugar a fenómenos de blindaje (shielding effects), cuyo efecto es que la carga aparente de una macromolécula resulte algo más baja en magnitud que su carga real. Además, la atmósfera iónica de la partícula que está migrando es interrumpida parcialmente por el campo eléctrico y por el movimiento de las partículas cargadas a través del medio soporte, de modo que el campo eléctrico no es estrictamente una constante a través del medio soporte. Por estas razones, los valores de movilidad divulgados para las proteínas y los ácidos nucleicos dependen de las condiciones experimentales.

Tres formas básicas de electroforesis se han utilizado. La *electroforesis de límite móvil* (*moving-boundary electrophoresis*) se realiza en una celda en forma de “U”, según puede observarse en la Figura 9.3. La solución del analito está situada inicialmente en el fondo de la U, y tiene una alta concentración de un componente que no ionizable, tal como sacarosa, glicerol o etilen-glicol, de tal manera de aumentar su densidad y reducir al mínimo la mezcla inicial en los límites de las soluciones tampónes diluidas, presentes en los compartimientos anódicos y catódicos. Cuando se aplica el campo eléctrico, la migración de los componentes ocurre en ambas direcciones, según sus cargas, y los límites entre la solución del analito y las soluciones tapón se mueven hacia los electrodos mientras que procede la separación. La migración del analito se estudia normalmente midiendo el índice de refracción, mediante detectores colocados cerca de los extremos superiores de la celda. La electroforesis de límite móvil fue la primera técnica electroforética utilizada; es empleada raramente hoy, excepto en las situaciones donde los valores exactos de movilidad son requeridos.

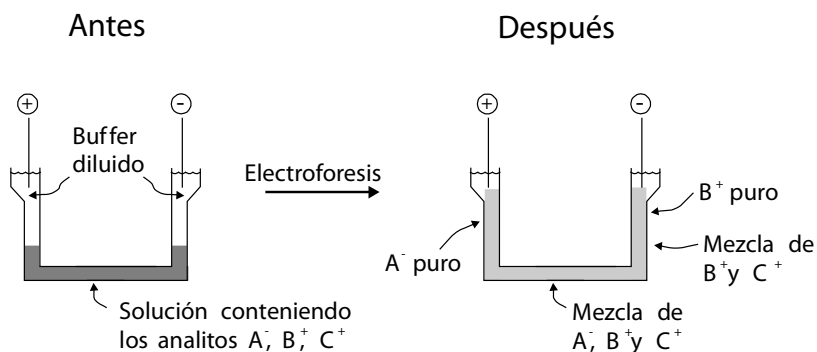


Figura 9.3. Electroforesis de límite móvil.

La *electroforesis de zona* (*zone electrophoresis*) se utiliza extensivamente en los laboratorios de investigación modernos y laboratorios clínicos. En esta técnica, los componentes de la mezcla del analito se separan totalmente para formar zonas discretas, o bandas, que se pueden estabilizar utilizando un medio soporte o pueden existir como zonas libres. La solución del analito se aplica como un punto o banda, y el campo eléctrico hace que la banda inicial se separe en las bandas componentes durante la migración, según puede verse en la Figura 9.4.

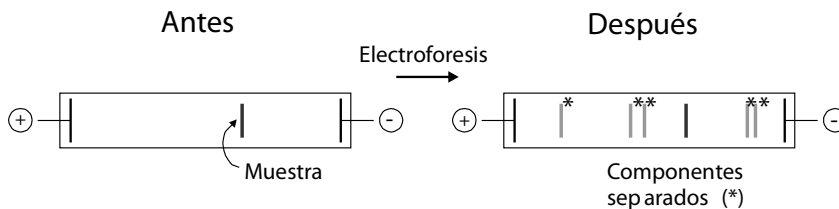


Figura 9.4. Electroforesis de zona.

La electroforesis de zona se utiliza para el análisis de mezclas complejas de biomoléculas, para la determinación del peso molecular y de la pureza de proteínas y de ácidos nucleicos y para una variedad de pruebas de diagnóstico. No se utiliza para la determinación cuantitativa de la movilidad. El uso de medios soporte previene disturbios mecánicos y la convección, que son producidos por cambios de temperatura y altas concentraciones locales de biopolímeros; de esta manera disminuye el ensanchamiento de las bandas. Los soportes pueden actuar como adsorbentes, como el papel, o como tamices moleculares, como los geles de agarosa y de poliacrilamida. Los geles del almidón exhiben ambas características, siendo tanto la adsorción del analito como el tamizado molecular factores importantes que contribuyen a la separación de las bandas. Los geles usados en electroforesis son geles continuos, más bien que los geles moldeados o de partículas usados en cromatografía. En electroforesis de zona, las bandas de los analitos migran a velocidades constantes, características; por esta razón, alguna especie coloreada se agrega a las muestras para la visualización del progreso de la separación.

La *electroforesis de estado estacionario* (*steady-state electrophoresis*) es distinta de la electroforesis de límite móvil y de zona en que las últimas posiciones de las bandas no son dependientes del tiempo. Después de que la electroforesis haya procedido por cierto tiempo, se alcanza un estado estacionario en donde las anchuras y las posiciones de las bandas son constantes. En las técnicas de isoelectroforesis (o isoelectroenfoque), por ejemplo, un gradiente estable de pH se crea entre los extremos anódicos y catódicos del material soporte; durante una corrida electroforética, una biomolécula migrará en este gradiente de pH hasta que alcance un pH en el cual su carga neta sea igual a cero. Para las proteínas y los polipéptidos, este pH es el punto isoeléctrico. La isoelectroforesis tiene un poder resolutivo muy elevado, y será tratada extensivamente en el Capítulo 11.

9.2 Medios soporte electroforéticos

9.2.1 Papel

La electroforesis en papel, o celulosa, fue introducida en los comienzos de los años 50 como técnica para la separación de proteínas. Antes del comienzo de la corrida electroforética,

una hoja de celulosa se satura con la solución tampón, y se coloca en una cuba o recipiente, según se observa en la Figura 9.5. La muestra entonces es aplicada como un punto o línea, se cubre la cuba y se aplica el campo eléctrico. Después de que la separación haya procedido por un tiempo suficiente, el papel se retira y se seca. Entonces, los componentes separados son localizados por su color, por su fluorescencia bajo luz ultravioleta, o después de un proceso de tinción utilizando colorantes. Si los componentes habían sido marcados radioactivamente, una autoradiografía del papel entero permitirá visualizar la separación de los componentes de la muestra.

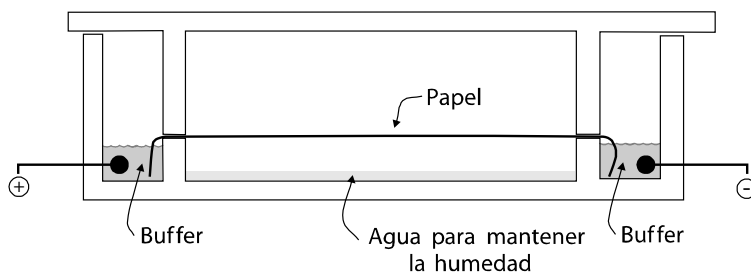


Figura 9.5. Disposición experimental para electroforesis en papel.

Los componentes pueden ser eluidos del papel después de la separación para realizar análisis adicionales. Esto se logra simplemente cortando la zona del interés del papel, y (a) remojando este papel en un volumen pequeño de solución tampón, (b) lavando un pedazo triangular del papel con solución tampón, y recogiendo gotas de la extremidad, o (c) liberando el componente de interés del papel mediante electroforesis en un pequeño volumen de solución tampón. La electroforesis en papel de baja tensión es utilizada raramente hoy, pues ha sido superada por técnicas que utilizan geles. Sin embargo, la electroforesis en papel de alto voltaje sigue siendo útil para la separación de moléculas pequeñas, tales como aminoácidos y nucleótidos; en estos analitos, su baja carga implica una baja movilidad, y su tamaño pequeño produce un significativo ensanchamiento de las bandas. La técnica de alto voltaje permite que la separación se logre rápidamente, pero debido a las altas corrientes implicadas, se genera calor (como i^2R), y el uso de placas refrigerantes es necesario (Figura 9.6) para mantener la temperatura constante. Una bolsa inflable se utiliza debajo de las placas refrigerantes, actuando como soporte.

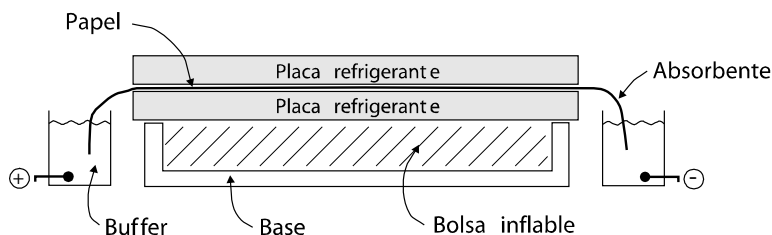


Figura 9.6. Electroforesis en papel de alto voltaje, con sistema refrigerante.

La resolución completa de mezclas de aminoácidos o de nucleótidos no es siempre posible después de una única corrida a alto voltaje. Por esta razón, las técnicas bidimensionales han sido desarrolladas. Se basan en la utilización de dos electroforesis consecutivas, la segunda perpendicular a la primera, o bien electroforesis seguida por cromatografía (también en un sentido “perpendicular”) puede ser utilizada. La selección cuidadosa de las soluciones tampón y del eluyente de la cromatografía permite la resolución de bandas superpuestas al realizar la segunda dimensión.

El acetato de celulosa fue introducido en 1957 como alternativa a la celulosa (papel) como material de soporte. La celulosa posee características tales que fenómenos electroforéticos y cromatográficos ocurren durante la separación, puesto que muchos componentes se fijarán por adsorción sobre la celulosa, o bien pueden interactuar con los grupos hidroxilo presentes en este material soporte. Debido a esto, las manchas o bandas exhiben “chorreado” (tailing) y la resolución es baja. El acetato de celulosa reduce al mínimo el efecto de adsorción, puesto que la mayoría de los grupos hidroxilo han sido acetilados. Las separaciones que usan acetato de celulosa son más rápidas, con una resolución mejorada y menos chorreado, por lo que permite una mayor sensibilidad (manchas o bandas más concentradas). Además, el teñido inespecífico del acetato de celulosa durante el proceso de revelado es más bajo que el papel, puesto que la adsorción del colorante también se reduce al mínimo. El acetato de celulosa tiene otras dos ventajas sobre el papel: es transparente, facilitando la detección óptica de las bandas, y se disuelve fácilmente en una variedad de solventes, facilitando la elución y el aislamiento de los componentes separados.

9.2.2 Geles de almidón

El almidón fue el primer medio soporte en estado gel usado para una separación electroforética, introducido en 1958. El gel es preparado calentando una pasta de almidón de papa en la solución tampón que será utilizada para la electroforesis, hasta que los granos del almidón estallan y la mezcla originalmente heterogénea llega a ser transparente y homogénea. La solución caliente después se vierte en un recipiente horizontal y se deja enfriar a temperatura ambiente, obteniéndose un gel semisólido. Según puede verse en la Figura 9.7, se corta una ranura en el gel, y la muestra (previamente mezclada con almidón para aumentar su viscosidad) se introduce en ella. La superficie del gel entonces se sella con cera o grasa. Los fieltros porosos adsorbentes se insertan directamente en los extremos del gel, estos funcionan como conexiones eléctricas entre el gel y los compartimentos anódicos y catódicos que contienen la solución tampón. Después de la corrida electroforética, el gel semisólido se quita del recipiente, y se corta en capas para proceder con la tinción. Esta técnica preparatoria permite obtener varias capas, que podrán ser teñidas con diferentes reactivos, y deja cantidades “macroscópicas” del material separado que puede

ser aislado para futuros análisis. La posición de la ranura de la muestra con respecto a los extremos anódicos y catódicos del gel se basa en el conocimiento previo disponible de la especie de interés (su punto isoeléctrico o su carga neta); si la carga del analito es desconocida, su posición se varía en múltiples experimentos electroforéticos hasta encontrar el procedimiento óptimo para la separación.

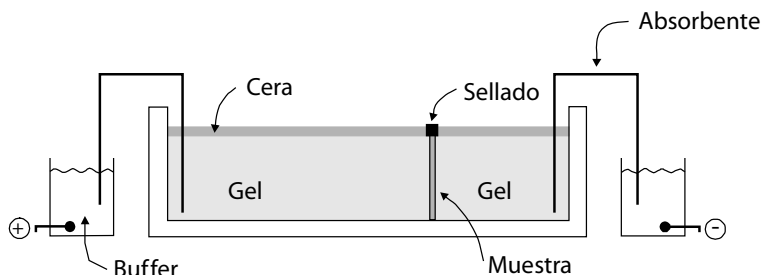


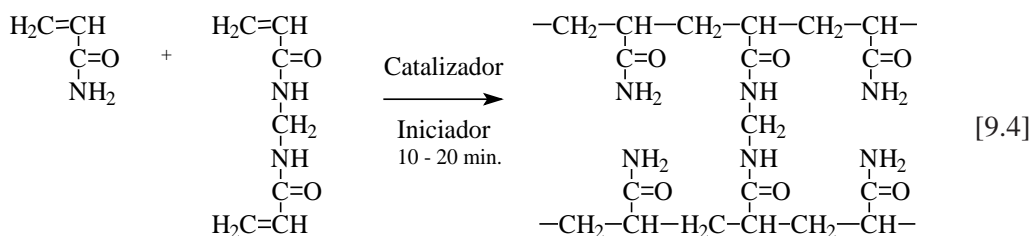
Figura 9.7. Electroforesis en gel de almidón.

La migración de la especie en el gel de almidón depende de la carga neta y el tamaño molecular. El gel tiene un efecto de tamizado molecular, de modo que las moléculas pequeñas tienden a tener mayores movibilidades. El efecto de tamizado se puede controlar en cierto grado con el tamaño del poro del gel, que puede ser modificado variando la concentración de almidón; sin embargo, la porosidad de los geles de almidón puede ser controlada solamente en un rango limitado de concentración, y las concentraciones de almidón que son muy altas o demasiado bajas producen geles que son excesivamente duros o blandos.

Los polímeros de almidón poseen cadenas laterales cargadas negativamente (carboxilatos) que pueden interactuar con las proteínas y obstaculizar la migración por un mecanismo de retención por intercambio iónico, de modo que los geles de almidón, de la misma manera que la celulosa, pueden poseer tanto características electroforéticas como cromatográficas. La carga negativa en el gel también conduce a un fenómeno llamado electroendosmosis (o electro-ósmosis), en donde los contraiones positivamente cargados (H_3O^+) en la solución tampón utilizada en la corrida electroforética se mueven hacia el cátodo. En efecto, la solución tampón fluye hacia el cátodo, y el transporte total de las especies analizadas en el gel es la suma del transporte debido a la migración electroforética y del transporte debido a la electroendosmosis. El efecto electroendosmótico se puede cuantificar usando azul dextrano, un oligosacárido sin carga que posee una movilidad electroforética igual a cero. El azul dextrano se puede agregar a una muestra, y la migración de azul dextrano respecto del origen (punto de sembrado de la muestra) se mide después de la finalización de la electroforesis; esta distancia puede ser restada de las otras distancias medidas para proporcionar distancias de migración corregidas. El almidón ha sido desplazado por los geles de poliácridamida y de agarosa para la mayoría de los usos, pero todavía se utiliza de vez en cuando para la separación de isoenzimas.

9.2.3 Geles de poliacrilamida

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) ha substituido la electroforesis en gel de almidón para la separación de proteínas, de fragmentos pequeños de RNA y de fragmentos muy pequeños de DNA. La poliacrilamida es más versátil que el almidón, porque el efecto de tamizado molecular se puede controlar a un grado mucho mayor, y porque la adsorción de proteínas al gel es insignificante. Los geles de poliacrilamida son preparados³ por la reacción de la acrilamida (monómero) con N, N'-metilenbis(acrilamida) (entrecruzante, también llamada simplemente bisacrilamida) en presencia de un catalizador y de un iniciador, según puede observarse en la Eq. 9.4. Los iniciadores incluyen el persulfato de amonio (APS) y el persulfato de potasio, donde el dianion $S_2O_8^{2-}$ se descompone en dos radicales SO_4^{\bullet} mientras que el catalizador comúnmente utilizado es tetrametiletilendiamina (TEMED, $(CH_3)_2N(CH_2)_2N(CH_3)_2$), que reacciona con el radical sulfato para producir una especie radical libre de larga vida.



La concentración de TEMED usado durante el fraguado del gel determina la longitud de las cadenas de poliacrilamida formadas, y por lo tanto la estabilidad mecánica del gel. Concentraciones más bajas del monómero requieren concentraciones más altas de TEMED, pero el exceso del catalizador debe ser reducido al mínimo, porque puede interactuar con las proteínas o alterar el pH de la solución tampón utilizado en la corrida. Debido a que la polimerización que ocurre durante el fraguado de un gel de poliacrilamida es un proceso al azar, una distribución de tamaños de poro ocurrirá. Se ha demostrado que el tamaño medio del poro depende de la cantidad total de acrilamida usada y del grado de reticulación. La concentración total del monómero está generalmente entre el 5-20% en peso.

Experimentalmente, la PAGE se puede emplear en columna, para las separaciones con fines preparatorios, o en una lámina (slab), donde varias muestras se pueden separar bajo idénticas condiciones.⁴ Estas configuraciones se muestran en la Figura 9.8. La preparación de una columna de PAGE comienza con un tubo de diámetro interno cercano a 5-10 mm, de 10 cm o más de longitud. Durante la polimerización del gel, la mezcla del gel está generalmente

3. E.G. Richards y R. Lecanidou en "Electrophoresis and Isoelectric Focussing in Polyacrylamide Gels", R.C. Allen and H.R. Maurer, Eds., Walter de Gruyter, Berlin, 1974, pp. 16-22.

4. M. Melvin, "Electrophoresis", Wiley, New York, 1987, pp. 34-35.

cubierta con agua para dar una superficie superior plana; este agregado de agua debe realizarse muy suavemente, para evitar convección y mezcla. Después del fraguado, se quita el agua, y se aplica la muestra. Las muestras se suspenden en una solución concentrada de sacarosa (de alta densidad) y se aplican sobre el gel; de esta manera se evita su mezcla con la solución tampón del compartimiento del electrodo superior de la celda electroforética (generalmente catódico). La corrida se comienza a baja corriente (1 mA por cerca de 30 minutos) para permitir que toda la muestra entre en el gel. La corriente entonces se aumenta a 2-5 mA durante la corrida. Un colorante indicador del frente de la corrida (tracking dye), como el azul del bromofenol (aniónico) o el azul de metileno (catiónico) se agrega a la muestra para controlar el progreso de la separación. Las soluciones tampón son a menudo refrigeradas y agitadas para minimizar el calentamiento i^2R y los cambios locales de pH que pueden ocurrir cerca de la interfase entre el gel y la solución tampón.

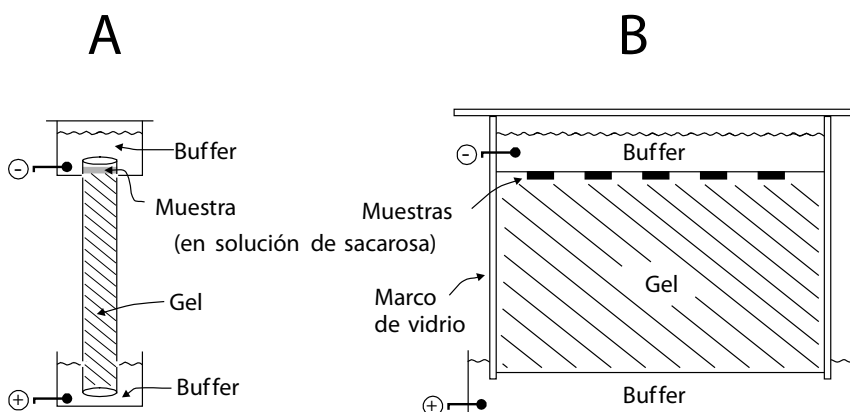


Figura 9.8. Disposición experimental para PAGE (A) en columna y (B) en lámina.

Cuando el colorante indicador ha migrado hasta el final del gel, este se remueve aplicando presión en uno de sus extremos, y las proteínas son fijadas dentro del gel mediante precipitación (ésta ocurre durante un paso de fijación, en la que el gel se sumerge en una solución del ácido tricloroacético, TCA) siendo el siguiente paso la tinción, que permite la detección de los componentes separados.

La PAGE en láminas permite la electroforesis simultánea de varias muestras en condiciones idénticas de corrida. Esta técnica tiene mayor poder resolutivo que la PAGE en columna, y se utiliza a menudo para las determinaciones de peso molecular y de pureza. Debido a que la lámina es relativamente fina, la disipación de calor es más eficiente en una lámina que en una columna. La lámina puede ser utilizada verticalmente u horizontalmente, pero en la práctica, solo se utiliza el método con láminas horizontales cuando las concentraciones de monómero más entrecruzante son bajas, resultando un gel muy blando e inestable. Un gel de lámina se prepara de la misma manera que un gel de columna, excepto que un peine, o formador de ranuras, se inserta antes de la polimerización. Al retirar el peine después de que

el gel este completamente polimerizado deja pozos para las muestras en el gel, separados uno de otro por tiras continuas de gel.

En la electroforesis de zona, dos componentes se consideran separados cuando la diferencia en distancias de la migración excede el ancho de la banda original de la muestra. Debido a que las bandas se ensanchan por fenómenos difusionales, la nitidez de las bandas disminuye con el aumento del tiempo de la corrida. Un método usado para mejorar el poder resolutivo de la electroforesis de zona implica el uso de dos diferentes tipos de gel (por ello es denominada electroforesis discontinua), uno de ellos denominado gel concentrador (stacking gel), sobre el que se siembra la muestra, y otro denominado gel separador (running gel), a continuación del anterior. Esta técnica aplicada a electroforesis en columna es denominada generalmente electroforesis de “disco”,⁵ debido a que la discontinuidad de la fuerza del campo eléctrico resulta en una banda muy estrecha de muestra, cuando esta penetra en el gel separador. La Figura 9.9 muestra los componentes de los geles y de las soluciones tampón utilizados en este método.

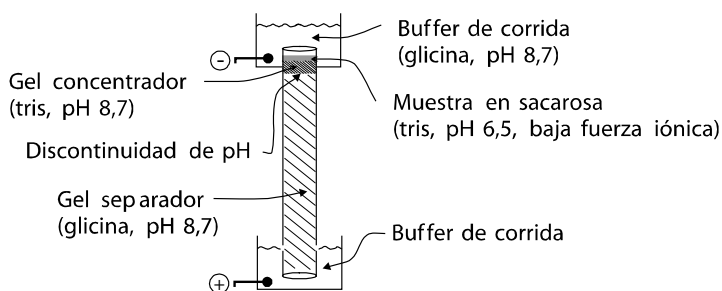


Figura 9.9. PAGE en columna de disco, con un gel concentrador de 2-4% de monómero, y un gel separador de 5-20% monómero; los valores típicos son 2.5% y 15%, respectivamente.

El gel separador en electroforesis de disco se fragua en presencia de la solución tampón separadora, típicamente una solución tampón de glicina de pH alto. El gel concentrador se fragua en presencia de una solución tampón de tris a menor pH y fuerza iónica. Debido a que la concentración del monómero es mucho más baja en el gel concentrador, el frenamiento friccional es más bajo y la movilidad del analito es más alta. El gel concentrador mejora la resolución debido a la discontinuidad de pH, y el efecto de los diferentes iones que embeben los dos geles. A pH 6,5, la glicina existe como zwitterion (también llamado ión doble), con una movilidad igual a cero debido a su carga neta igual a cero. A pH 8,7, la glicina existe principalmente como un anión, puesto que el grupo amino ha sido desprotonado; su movilidad es distinta a cero y migrará hacia el ánodo. En la discontinuidad de pH, existe una deficiencia de iones móviles debido al cambio del equilibrio de la glicina hacia el zwitterion. Esto causa una fuerza de campo eléctrico localmente alta en la discontinuidad, debido a la

5. U.K. Laemmli, *Nature* **227**, 1970, 680-685.

alta resistencia de la interfase con escasa carga. Para mantener el flujo de la corriente en esta región del gel, las proteínas aniónicas emigran rápidamente y se concentran en el gel blando cerca de la discontinuidad. Las proteínas forman bandas estrechas entre el glicinato en el gel separador y los iones cloruro en el gel concentrador. Las bandas estrechas entran en el gel separador en esta forma preconcentrada, permitiendo una resolución mejorada al terminar la corrida electroforética. Tiempos de corrida tan cortos como veinte minutos se pueden utilizar en electroforesis de disco, debido a su elevada resolución.

El tamaño de poro de un gel de poliacrilamida controla la movilidad y la resolución de los componentes de la muestra debido al efecto de tamizado que producen los poros del gel en las especies macromoleculares.⁶ El tamaño del poro puede ser controlado variando las concentraciones totales del monómero y del entrecruzante, y variando su cociente. La composición de los geles están definidas por dos parámetros, su %T y el valor de %C, que representan el contenido total y el contenido de entrecruzante, respectivamente. Estos parámetros son definidos por las Eqs. 9.5 y 9.6, a continuación:

$$\%T = (\text{Peso en gramos del monómero} + \text{entrecruzante}) / (100 \text{ mL}) \quad [9.5]$$

$$\%C = 100 \times (\text{Gramos de entrecruzante}) / (\text{Gramos de monómero} + \text{entrecruzante}) \quad [9.6]$$

El peso molecular de una proteína y su carga neta pueden ser determinados realizando electroforesis en geles con %C constante, variando %T del gel al gel. Después de la separación, la migración de la proteína se mide en forma relativa a un colorante que tiene mayor movilidad (marcador), y se calcula el valor de R_f :

$$R_f = (\text{Distancia de migración de la proteína}) / (\text{distancia de migración del marcador})$$

donde el marcador no está restringido por la porosidad del gel. Un gráfico de Ferguson⁷ puede entonces ser construido dibujando el $\log(R_f)$ versus el %T. Luego de trazar una recta, el antilogaritmo del valor de intercepción del eje y de este diagrama (%T = 0) proporciona el cociente de la carga de la proteína a la carga del marcador, y la pendiente de la línea recta es proporcional al peso molecular de la proteína. Mediante la utilización de proteínas estándares de peso molecular conocido en una calle paralela a la proteína incógnita, utilizando un gel laminar, un diagrama de la pendiente de Ferguson versus peso molecular se utiliza para determinar el peso molecular de la incógnita.

Si la determinación de la carga neta en la proteína incógnita no es de interés, su peso molecular se puede determinar más rápidamente usando el método denominado SDS-

6. A. Chrambach, "The Practice of Quantitative Gel Electrophoresis", VCH Publishers, Weinheim, Germany, 1985. pp. 67-73.

7. A. Chrambach, "The Practice of Quantitative Gel Electrophoresis", VCH Publishers, Weinheim, Germany, 1985. pp. 111-128.

PAGE.⁸ En este método, un solo gel es preparado en presencia de aproximadamente 0,1% de dodecil sulfato de sodio (SDS), que está también presente en la disolución tampón utilizada. Las muestras proteicas (los marcadores de peso molecular y la incógnita) son pretratadas calentándolas en una solución conteniendo 1% de SDS y 0,1% de mercaptoetanol. El mercaptoetanol reduce los enlaces disulfuro que mantienen la estructura cuaternaria y terciaria, para formar las espirales al azar (random coils) de las subunidades, mientras que el SDS se combina con las regiones hidrofóbicas de la proteína, uniéndose una cantidad relativamente constante de 1,4 gramos de SDS por cada gramo de proteína. Esta interacción de unión no específica produce especies con una *carga constante por unidad de peso* (proveniente de los grupos sulfato del SDS), puesto que la contribución de las cadenas laterales cargadas de la proteína llega a ser insignificante. Las distancias de migración entonces son influenciadas solamente por el efecto de tamizando molecular y relacionadas directamente con el peso molecular de la proteína o de la subunidad. Un diagrama de la distancia versus el log(MW) es lineal y con pendiente negativa, y se puede utilizar como curva de calibración para las determinaciones de proteínas incógnitas. Debe notarse que las glicoproteínas se unen al SDS en un grado inferior que las proteínas,⁹ por ello, al realizar la curva de calibración para una glicoproteína desconocida deberán utilizarse estándares de peso molecular compuestos por glicoproteínas. Utilizando SDS-PAGE se pueden determinar pesos moleculares de proteínas con una exactitud del orden del 5% en el rango de 10^4 - 10^6 Da.

9.2.4 Geles de agarosa

La agarosa fue utilizada por primera vez como medio de electroforesis a principios de la década del '70. Es un polímero lineal de D-galactosa y de 3,6-anhidrogalactosa que se purifica de algunas algas marinas. La agarosa contiene cerca de 0,04% de sulfato, se puede disolver en agua hirviendo y forma un gel continuo cuando se enfría por debajo de los 38 °C; la estructura del gel es mantenida por uniones tipo puente de hidrógeno.¹⁰ Como con los geles de poliacrilamida, la concentración de agarosa en el gel determina el tamaño medio de poro. Los tamaños de poro son mucho más grandes con agarosa que con los geles de poliacrilamida, por lo que cuando es necesario separar y cuantificar ácidos nucleicos o proteínas demasiado grandes se utilizan los geles de agarosa. Los geles laminares de agarosa se utilizan en celdas verticales y horizontales. En el modo vertical, geles con concentraciones muy bajas de agarosa (hasta el 0,8%) pueden ser preparados, permitiendo la separación de proteínas y ácidos nucleicos con pesos moleculares de hasta $1,5 \times 10^8$ daltons. En el

8. B.D. Hames en "Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach", B.D. Hames y D. Rickwood, Eds., Oxford University Press, New York, 1981. pp. 1-86.

9. B.S. Dunbar, "Two-Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques", Plenum Press, New York, 1987. p. 19.

10. P. Serwer, S.J. Hayes y G.A. Griess, *Anal. Biochem.* **152**, 1986, 339-345.

modo horizontal, geles de agarosa con una concentración tan baja como 0,2% pueden ser preparados, permitiendo que moléculas con pesos moleculares de cerca de $1,5 \times 10^8$ sean determinados. Equipos idénticos son utilizados para la electroforesis en geles de agarosa y PAGE. Los geles de agarosa tienden a ser relativamente frágiles (especialmente cuando se utilizan concentraciones muy bajas de agarosa), y son examinados directamente o se secan cuidadosamente, obteniéndose una película fina antes de proceder a la tinción.

Los geles de agarosa contienen grupos cargados, principalmente sulfato y algunos grupos carboxilato. Estos grupos cargados interactúan con los grupos cargados en las proteínas, dando lugar a efectos de intercambio iónico; pueden también provocar un flujo electro-osmótico significativo. El tratamiento previo de la agarosa en solución alcalina conduce a la hidrólisis de estos grupos, y mejora las características de filtrado molecular de los geles. Las características físicas de los geles de agarosa, especialmente la viscosidad, son muy sensibles a las fluctuaciones de la temperatura, de modo que el control estricto de la temperatura durante la electroforesis es esencial. Debido a los grandes poros de los geles de agarosa, su área más importante de uso está en la separación y análisis de DNA.

9.2.5 Geles de poliacrilamida-agarosa

Geles mixtos que contienen poliacrilamida y agarosa han sido utilizados para alcanzar tamaños intermedios de poro en los geles, y al mismo tiempo buena resistencia mecánica.¹¹ Estos geles se pueden utilizar para ácidos nucleicos, nucleoproteínas y otras proteínas demasiado grandes para entrar en los poros de los geles estándares de poliacrilamida.

9.3 Efecto de las condiciones experimentales en las separaciones electroforéticas

La temperatura influye de manera crítica sobre la resolución de los componentes de la muestra sometida a una corrida electroforética. La circulación de corriente a través del gel produce calentamiento por efecto Joule, que debe ser compensado por un sistema de enfriamiento eficiente. En ausencia de refrigeración, cinco factores contribuyen a la disminución de la resolución. Las corrientes convectivas ocurren debido a que la disolución también, más caliente cerca del centro del material soporte, tiene una densidad más baja que la disolución más fría cerca de las paredes; el agua tiene una densidad máxima a 4 °C, y a esta temperatura, la variación de la densidad con la temperatura es mínima; por ello

11. P.M. Horowitz, J.C. Lee, G.A. Williams, R.F. Williams y L.D. Barnes, *Anal. Biochem.* **143**, 1984, 333-340.

las corridas deben realizarse de ser posible a 4 °C. La difusión, que conduce a ensanchar o borrar las bandas, es más significativa a temperaturas más altas, especialmente si la corrida requiere varias horas. Una distorsión de las bandas ocurre cuando la refrigeración es inadecuada, puesto que aquellas partes de las bandas que se encuentran en las partes más calientes del gel (en el interior) se mueven más rápidamente que las que se encuentran en las regiones más frías (en el exterior); esta velocidad desigual conduce a bandas curvadas, y a veces al solapamiento con las bandas vecinas. En recipientes abiertos, la evaporación puede conducir a la deshidratación superficial del soporte sólido, produciéndose así cambios locales en la fuerza iónica; por esta razón se utilizan los recipientes cubiertos. Finalmente, la viscosidad varía con temperatura; temperaturas más altas conducen a geles más blandos y disminuyen los coeficientes friccionales, un efecto particularmente observable con los geles de agarosa.

El pH de la solución tampón utilizada en la corrida electroforética puede tener efectos dramáticos en la separación realizada. Éste no es normalmente el caso para los nucleótidos, polinucleótidos o los ácidos nucleicos; en estas especies, la carga neta es siempre negativa debido al esqueleto azúcar-fosfato, de carácter ácido, de modo que los cambios de pH en el rango 4-10 no afectan perceptiblemente las separaciones. Para las proteínas, sin embargo, la carga neta es dependiente del pH. Para valores de pH debajo del punto isoeléctrico (pI), una proteína tendrá carga positiva y migrará hacia el cátodo. Inversamente, si el pH > pI, la proteína posee una carga neta negativa y migra hacia el ánodo. Es posible que dos o más proteínas produzcan solamente una banda después de una corrida electroforética, si las condiciones son tales que las proteínas posean las mismas movilidades. Por esta razón, las separaciones de proteínas se deben realizar a dos o más valores de pH. Los estudios de la pureza o de la homogeneidad de una muestra se deben realizar siempre usando corridas múltiples a diferentes valores de pH.

La fuerza iónica de la solución tampón utilizada en la corrida también influye en la calidad de la separación alcanzada. Las interacciones entre los grupos superficiales de especies cargadas y los iones del tampón dan lugar a una atmósfera de iones cercana a las macromoléculas cargadas. Tanto la carga neta como la movilidad son afectadas por la fuerza iónica, y los analitos proteicos son afectados sensiblemente. Una regla general para la electroforesis es que la fuerza iónica de la solución tampón utilizada en la corrida debe ser mantenida baja para reducir al mínimo los efectos del contra ión, mientras que mantiene una solubilidad adecuada de los componentes de la muestra.

9.4 Gradientes de fuerza del campo eléctrico

La variación de la fuerza del campo eléctrico con la distancia a lo largo del gel conduce a la separación optimizada de componentes de menor movilidad. Los métodos

estándares para la preparación de los geles electroforéticos producen campos eléctricos de fuerza constante a través del gel, donde el cambio de voltaje por unidad de distancia es una constante en el gel entero; en estos geles, las especies de elevada movilidad se separan bien, pero las especies cercanas del origen se agrupan juntas en una zona difusa debido a la pobre resolución. Esta baja resolución cerca del origen puede ser mejorada generando un gradiente en la fuerza del campo eléctrico a través del gel; la alta fuerza del campo cerca del origen aumenta la velocidad de las especies que migran lentamente. La Figura 9.10 compara los perfiles de voltaje versus distancia para geles lineales y de gradiente.

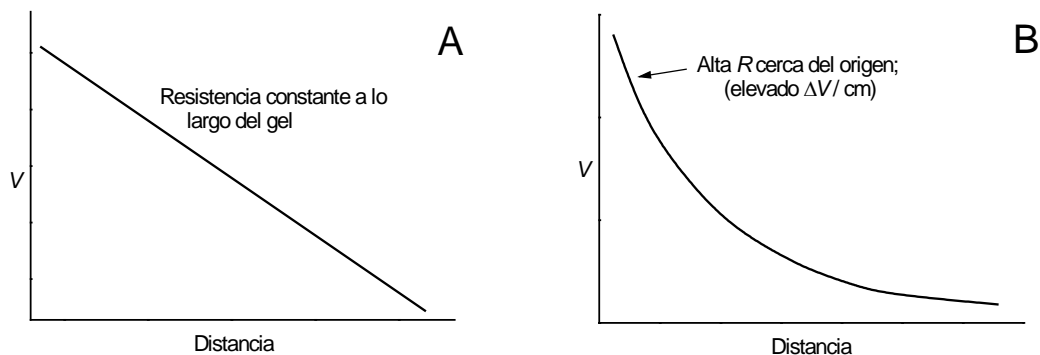


Figura 9.10. Voltaje versus distancia para electroforesis en (A) un gel lineal, y (B) un gel de gradiente. Considerando la ley de Ohm, si la corriente es constante, el voltaje observado cambia siguiendo las características de la resistencia de los geles.

Tales gradientes pueden ser introducidos usando (a) geles en forma de cuña, o (b) gradientes de fuerza iónica. Con los geles de cuña, la resistencia aumenta con la disminución del área de sección transversal, de modo que el extremo fino esté cerca del origen, y la muestra migra hacia el extremo más grueso. Estos geles se fraguan en un molde inclinado. Los geles que usan gradientes de fuerza iónica están preparados con poliacrilamida fraguada sobre un gradiente de fuerza iónica. El extremo del gel correspondiente a la solución tampón más diluida tiene resistencia más alta; éste es el origen de la muestra, de modo que la muestra emigre hacia el extremo que tiene resistencia más baja. Una comparación¹² de la separación alcanzada para una de las mezclas de reacción utilizada para el secuenciado de DNA (la reacción de T), utilizando un gel de poliacrilamida al 6% lineal, en cuña y con gradiente de fuerza iónica se puede observar en la Figura 9.11.

12. A.T. Bankier y B.G. Barrel en "Nucleic Acids Sequencing: A Practical Approach", C.J. Howe y E.S. Ward, Eds., Oxford University Press, New York, 1989, pp. 73-77.

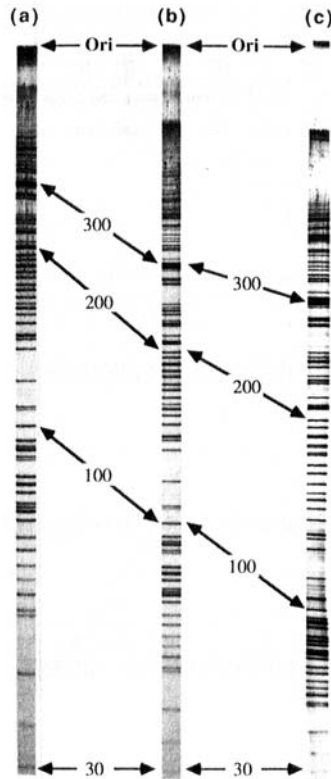


Figura 9.11. Comparación de la separación de las bandas en gels lineales, en forma de cuña y con gradientes de fuerza iónica. La reacción de T de un experimento de secuenciación realizado sobre el DNA de M13 mp8 fue corrida en tres diferentes gels de 6% de poliacrilamida y 40 centímetros de largo, usando (A) un gel lineal estándar, (B) un gel de cuña de 0,35 mm a 1,05 mm, y (C) un gradiente de solución tampón tris de 0,05 a 0,50 M. Reproducido, con permiso, de A. T. Bankier y B. G. Barrell en *“Nucleic Acids Sequencing: A Practical Approach”*, C. J. Howe and E. S. Ward, Eds., Oxford University Press, New York, 1989. © IRL Press at Oxford University Press 1989.

9.5 Detección de proteínas y ácidos nucleicos después de la separación electroforética

Después de una corrida electroforética, la banda del colorante indicador es a menudo la única banda visible. La detección de proteínas y de ácidos nucleicos que han sido separados requiere el tratamiento posterior para poder lograr visualizar las bandas obtenidas. Este tratamiento se puede realizar directamente en el gel, o puede requerir un paso en el cual el patrón entero de la separación es transferido sobre una fina membrana. La opción del

método de detección seleccionado depende de las concentraciones de analitos en las bandas separadas y si la recuperación de la muestra purificada es requerida.

9.5.1 Tinciones y colorantes¹³

El método más común para la visualización implica teñir un gel entero con una especie que se fije no selectivamente a las proteínas o a los ácidos nucleicos. Los geles utilizados para separar mezclas de proteínas son removidos del aparato de electroforesis y “fijados” por la inmersión en ácido tricloroacético al 10%, para precipitar las proteínas y prevenir el ensanchamiento de las bandas por fenómenos difusionales, así como la pérdida del analito durante el proceso de teñido. Luego el gel es lavado, y sumergido en una solución (0,1-0,2% w/v) del colorante, dando por resultado la absorción del colorante a través del gel. Un paso siguiente de desteñido permite eliminar la mayor parte del colorante, el que permanecerá en el gel únicamente donde las interacciones con la proteína evitan su eliminación. Similares procedimientos se utilizan para la detección de ácidos nucleicos. La Tabla 9.1 enumera algunos colorantes utilizados para las proteínas, las glicoproteínas y los ácidos nucleicos.

Colorante	Abs. máx. (nm)	Usos
Negro Amida 10B (Amido Black 10B)	620	Colorante general para proteínas
Coomassie Brilliant Blue R-250	590	Colorante general para proteínas, 10 veces más sensitivo que el Negro Amida
Coomassie Brilliant Blue G-250	595	Colorante general para proteínas
Azul Alciano (Alcian Blue)	630	Glicoproteínas
Uniblue A	-	Tinción de proteínas
Azul de Metileno	665	RNA, RNasa
Verde de Metilo	635	DNA nativo, colorante indicador en medios ácidos o neutros (tracking dye)
Verde Rápido FCF (Fast Green FCF)	610	Tinción de proteínas
Fuscina Básica	550	Glicoproteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas ricas en ácido siálico
Pironina Y	510	RNA, colorante indicador en medios ácidos (tracking dye)
Azul de Bromofenol	595	Colorante indicador en medios neutros y alcalinos (tracking dye)

13. P.G. Righetti, “*Isoelectric Focussing: Theory, Methodology and Applications*”, Elsevier, New York, 1983. p. 209.

Verde de Bromocresol	-	Colorante indicador para DNA en electroforesis en agarosa (tracking dye)
Crocein Scarlet	505	Inmunoelectroforesis
Xileno Cianol FF (Xylene Cyanole FF)	-	Colorante indicador para secuenciación de DNA (tracking dye)
Azul de Toluidina	620	RNA, RNasa, mucopolisacáridos
Bromuro de Etidio	-	Detección fluorométrica de DNA
Stains All	-	Colorante general para proteínas

Tabla 9.1. Colorantes para electroforesis¹³. Reproducido, con permiso, de P.G. Righetti, “*Isoelectric Focussing: Theory, Methodology and Applications*”, Elsevier, New York, 1983. © 1983, Elsevier Science Publishers B.V.

Se ha introducido una tinción de plata que es cientos de veces más sensible para las proteínas que el Azul de Coomassie, y cuatro veces más sensible para los ácidos nucleicos que el bromuro de etidio (ethidium bromide).¹⁴ Esta coloración se basa en la reducción de Ag^+ por grupos funcionales tioles, tirosina y amina presentes en las proteínas y por las bases púricas en el DNA. La plata sólida formada por la reducción precipita en el gel dando lugar a una coloración permanente en las zonas donde se encuentran proteínas o ácidos nucleicos, y no es reducida por los componentes de la solución tampón o los materiales del gel, de modo que la coloración inespecífica del gel es mínima. La Figura 9.12 muestra una comparación de geles idénticos teñidos con Azul de Coomassie y con tinción de plata.

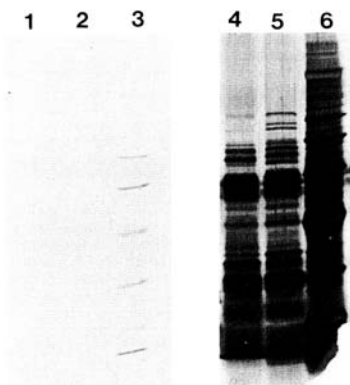


Figura 9.12. Comparación de geles idénticos de poliacrilamida teñidos con Coomassie Blue (las calles 1-3) y tinción de plata (calles 4-6). Las concentraciones iniciales de las muestras son idénticas para las calles 1 y 4, 2 y 5, y 3 y 6. Reproducido, con permiso, de B. S. Dunbar, “*Two-Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques*”, Plenum Press, New York, 1987. © 1987 Plenum Press

14. C.R. Merrill, *Nature* **343**, 1990, 779-780.

Después de teñirse, los geles se pueden fotografiar bajo luz ultravioleta o visible, obteniéndose de esta forma la información cualitativa sobre el número y las posiciones de las bandas. Alternativamente, la información cuantitativa puede ser obtenida mediante la exploración del gel con un densitómetro (Figura 9.13) que mide la intensidad de luz transmitida a través del gel en función de la posición en el gel.

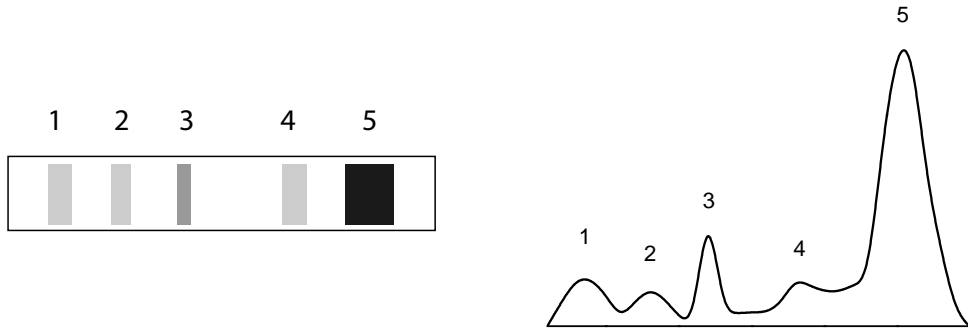


Figura 9.13. Trazado producido por un densitómetro de un gel electroforético luego de su tinción.

La gráfica o dibujo producido por el densitómetro es utilizado para medir las posiciones máximas (distancia de la migración) y pureza o las concentraciones relativas de componentes por la integración de las áreas bajo los picos. Los densitómetros modernos realizan esta operación automáticamente. Para el trabajo cuantitativo, la sobrecarga de los geles debe ser evitada, puesto que ésta produce bandas de muestra muy concentradas que pueden inhibir la tinción proporcional y conduce a subestimar las concentraciones de la muestra.

9.5.2 Detección de enzimas mediante la tinción por sustrato¹⁵

Los sistemas de tinción por actividad son de gran importancia durante el aislamiento, la purificación y la caracterización de enzimas, puesto que una reacción catalítica particular está implicada y la detección de esta actividad conduce a la identificación inequívoca de la banda de interés en el gel electroforético. Después de la separación, el gel se remueve del aparato de electroforesis y se sumerge en un volumen mínimo de una solución del sustrato. La detección se basa en la formación de un producto coloreado por la acción catalítica de la enzima en las bandas donde ella está presente. Algunos ejemplos de tinción por actividad se presentan la Tabla 9.2.

15. C.R. Righetti, *"Isoelectric Focussing: Theory, Methodology and Applications"*, Elsevier, New York, 1983. pp. 230-231.

Enzima	Procedimientos
Fosfatasa ácida de glóbulos rojos	Fenoltaleína difosfato y posteriormente en medio básico
Fosfoglucomutasa	Reducción de sales de tetrazolium (MTT)
Fosfatasa alcalina placentaria	β -Naftil fosfato y Fast Blue RR diazo sales
β -Glucuronidasa	8-hidroxiquinolina más Blue RR sales
Colinesterasa	6-bromo-2-naphthyl-carbonaphthoxycholine yoduro más Blue B sales
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Aplicación de una capa de agar conteniendo una sal de tetrazolium
6-Fosfogluconato deshidrogenasa	Aplicación de una capa de agar conteniendo una sal de tetrazolium
Citocromo oxidasa	α -Naftol más dimethylparaphenylenediamine
Esterasas	α -Naftilbutirato más Fast Blue RR diazo sales
Deshidrogenasas lácticas y málicas	Reducción de Nitro Blue tetrazolium sales
Fosfatasa ácida	α -Naftil fosfato ácido de sodio más 5-cloro- <i>o</i> -toluidina diazo sales
Fosforilasa	Reducción de fosfato de plata a Ag por luz UV
Succinato, β -hidroxibutirico y glutamato deshidrogenasa	Reducción de Nitro Blue tetrazolium sales
Catalasa	Inhibición de la reacción de almidón yodo (gel de almidón)
Ceruloplasmina	O-Dianisidina
Leucina aminopeptidasa	Alanil- β -naftilamida más O-aminoazotolueno diazotizado
Hemoglobina (como peroxidasa)	Bencidina más peróxido de hidrógeno

Tabla 9.2. Tinciones por sustrato para la detección enzimática¹⁵. Reproducido, con permiso, de P.G. Righetti, “*Isoelectric Focussing: Theory, Methodology and Applications*”, Elsevier, New York, 1983. © 1983, Elsevier Science Publishers B.V.

La detección de enzimas mediante la tinción por actividad es importante no solamente para la detección directa de las enzimas separadas, sino también para la detección de proteínas no catalíticas, mediante la utilización de anticuerpos contra la proteína de interés, marcados enzimáticamente. La capacidad de detectar una actividad catalítica en particular reduce considerablemente la tinción de fondo del gel, y permite la identificación inequívoca de una especie analítica particular, aún cuando la muestra es una mezcla muy compleja.

9.5.3 El Southern Blot¹⁶

Este procedimiento fue introducido por E.M. Southern en 1975, y se utiliza para transferir el DNA de los geles de agarosa hacia la superficie de una membrana de nitrocelulosa o nylon, para su subsecuente detección. La transferencia a la nitrocelulosa se logra después de que el gel haya sido empapado en una solución desnaturalizante conteniendo NaCl en una concentración cercana a 1,5 M y NaOH de 0,5 M; esto dificulta el apareamiento de las bases del DNA de doble cadena, de modo que solamente la forma single cadena esté presente en el gel. El gel entonces se neutraliza a un pH de cercano a 8, y se coloca en un aparato para la transferencia, tal como el que se presenta en la Figura 9.14, abajo.

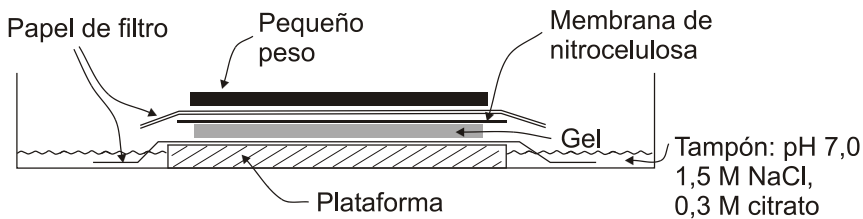


Figura 9.14. Aparato utilizado para Southern blot.

Una vez que el gel se haya colocado en el aparato para la transferencia, la solución tampón que se encuentra en cristizador (u otro recipiente adecuado) es forzado a través del gel por la acción absorbente del papel de filtro. La transferencia procede por cerca de 12 horas. Se substituyen los papeles de filtro superiores cuando se saturan con el tampón. La membrana de nitrocelulosa después se remueve, se seca al aire y se calienta a 80 °C por cerca de 2 horas para asegurar una fuerte unión del DNA al material de la membrana.

Las membranas de nylon han substituido en gran parte a las de nitrocelulosa para las transferencias de DNA, debido a que el nylon se ha demostrado más eficiente para la transferencia de fragmentos pequeños de DNA (< 200 bases), y es más estable a pHs extremos. Las transferencias al nylon siguen el mismo procedimiento que se describió anteriormente, excepto que el NaCl no es necesario en la solución desnaturalizante, y no se requiere ningún paso de “horneado” para mejorar la adhesión del DNA al material de la membrana. El DNA se puede unir covalentemente a las membranas de nylon por una breve exposición de la membrana (luego del Southern) a la luz ultravioleta. Estas membranas expuestas al UV con el DNA unido covalentemente permiten múltiple ciclos de detección y lavado sin que se produzca ensanchamiento difusional de las bandas.

16. E.M. Southern, *J. Mol. Biol.* **98**, 1975, 503-517.

9.5.4 El Northern Blot¹⁷

El northern blot se utiliza para transferir RNA desde geles de agarosa hasta la superficie de membranas de nitrocelulosa. Las condiciones para la transferencia son similares a las usadas en el Southern blot, a excepción de lo siguiente. La desnaturalización antes de la transferencia se hace con hidróxido de metilmercurio, glioxal o formaldehído en vez de hidróxido del sodio, porque el NaOH hidrolizaría el RNA en la posición 2'-hidroxil. El RNA no se une sólidamente a la nitrocelulosa hasta después del paso de horneado a 80 °C, por lo que no se utilizan lavados antes de este paso. Los geles con RNA no son teñidos para ser fotografiados antes del paso de transferencia, porque la tinción interfiere con la transferencia a la nitrocelulosa. Finalmente, precauciones especiales se requieren para prevenir la contaminación de las muestras con RNasa, incluyendo el tratamiento del material de vidrio y de las soluciones, así como el uso de guantes durante todo el procedimiento.

9.5.5 El Western Blot¹⁸

Este procedimiento es, en principio, similar al northern blot y al Southern blot, pero está diseñado para la transferencia de proteínas desde los geles hasta las membranas de nitrocelulosa. Una técnica electroforética se utiliza a menudo para acelerar la transferencia alrededor de unas diez veces; el aparato usado para tales transferencias se puede observar en la Figura 9.15. El proceso electroforético asegura que la transferencia completa de las proteínas ocurra más rápido, lográndose que el ensanchamiento difusional de las bandas sea mínimo.

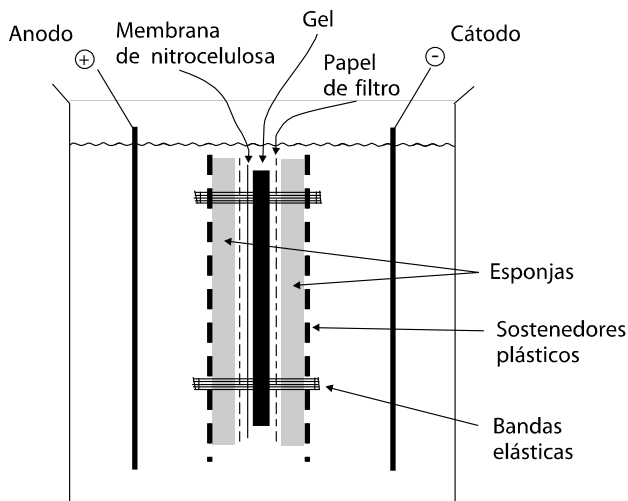


Figura 9.15. Aparato utilizado para la transferencia (western blot) de proteínas a la nitrocelulosa

17. D. Grierson en "Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach", D. Rickwood y B.D. Hames, Eds., Oxford University Press, New York, 1982. pp. 29-31.

18. P.G. Righetti, "Immobilized pH Gradients: Theory and Methodology", Elsevier, New York, 1990. pp. 158-160.

9.5.6 Detección de fragmentos de DNA sobre membranas con sondas de DNA

Las sondas (probes) de DNA están basadas en la elevada especificidad de las interacciones por puente de hidrógeno en cadenas de oligonucleótidos con longitudes de entre 20 y 1000 pares de bases. La sonda de DNA es un oligonucleótido al cual se le ha unido covalentemente un marcador detectable.¹⁹ La hibridación de la sonda al ácido nucleico blanco (analito) inmovilizado sobre membranas de nitrocelulosa o de nylon ocurre a través de uniones por puente de hidrógeno entre las bases A-T o G-C. Esta es un tipo de interacción relativamente débil para las pares de bases individuales, puesto que existen solamente dos (A-T) o tres enlaces de hidrógeno (G-C). Sin embargo, si la hibridación ocurre sobre un número de pares consecutivos de bases (> 5), el proceso es exotérmico a temperatura ambiente. La secuencia del oligonucleótido y la longitud de la sonda de DNA determinan la selectividad de la detección de una especie blanco. Por ejemplo, consideraciones estadísticas han demostrado que una sonda de 17 bases se puede utilizar para localizar un segmento único, cuando una cantidad de bases del orden a las contenidas en el genoma humano (3×10^9) son ordenadas al azar.²⁰ Por supuesto, el DNA no posee una secuencia estadísticamente al azar, por lo que sondas más largas son utilizadas generalmente. La hibridación en la membrana se utiliza para formar un heteroduplex, según se observa en la Figura 9.16.

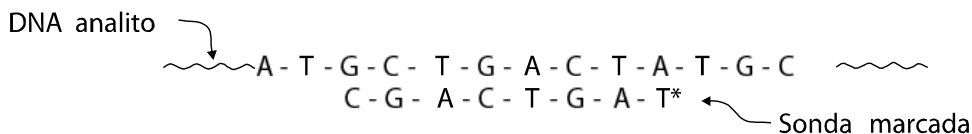


Figura 9.16. Heteroduplex entre el DNA blanco y la sonda de DNA marcada.

Los heteroduplex pueden ser disociados a baja fuerza iónica o a altas temperaturas. La temperatura en la cual la transición entre la doble cadena a la cadena simple se denomina la temperatura de fusión T_m . Sondas con alto contenido de G+C tienen valores más altos de T_m , debido a que un mayor número de enlaces de hidrógeno está presente en el heteroduplex.

Las sondas de DNA se pueden marcar utilizando átomos radioactivos (radiomarcación), grupos de átomos tales como fluoróforos, o enzimas unidas a cadenas laterales, para permitir la detección de las bandas obtenidas durante la separación que contienen la secuencia de interés. El marcador unido a la sonda de DNA no debe interferir con las uniones puente de hidrógeno entre la sonda y la secuencia blanco. El paso de hibridación es realizado

19. G.H. Keller y M.M. Manak, "DNA Probes", Macmillan, New York, 1989. pp. 1-23.

20. M. Nei y W.-H. Li, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1979, 5269.

sumergiendo la membrana de nitrocelulosa o de nylon en una solución que contiene un exceso de la sonda, e incubando a una temperatura apenas menor al T_m para el heteroduplex. Luego el exceso de la sonda se elimina lavando la membrana, la que luego se examina para la localización de la marca.

Las sondas de DNA son marcadas a menudo por el método denominado *translación de nick*.²¹ Este método utiliza las actividades combinadas de tres enzimas: DNasa I, 5'-3'-exonucleasa y 5'-3'-polimerasa. Las dos últimas enzimas están presentes en el complejo DNA polimerasa de *E. coli*. Como se muestra en la Figura 9.17, la DNasa I introduce roturas (o "nicks") en una única cadena, aleatoriamente, por hidrólisis de la cadena doble de DNA, para crear grupos 3'-hidroxilo libres. Entonces la exonucleasa remueve una o más de las bases del lado 5'-fosfato de esta región mellada, mientras que la polimerasa cataliza la incorporación de nucleótidos marcados sobre el lado 3'-hidroxilo, llenando las roturas o huecos con las bases marcadas. Los nucleótidos marcados que se incorporan son complementarios, es decir, la cadena que resulta tiene la misma secuencia que la cadena original. Mientras que procede la reacción, la zona de rotura cambia de lugar por una base en la dirección 3'; este proceso se permite que continúe hasta que el 30-60% de las bases totales hayan sido substituidas por los nucleótidos etiquetados. La purificación de la especie marcada de la sonda es innecesaria si la muestra original de DNA contenía solamente la secuencia del interés. Ajustando la concentración de DNasa I, es posible producir sondas cortas con muchas marcas incorporadas, o sondas largas con pocas marcas.

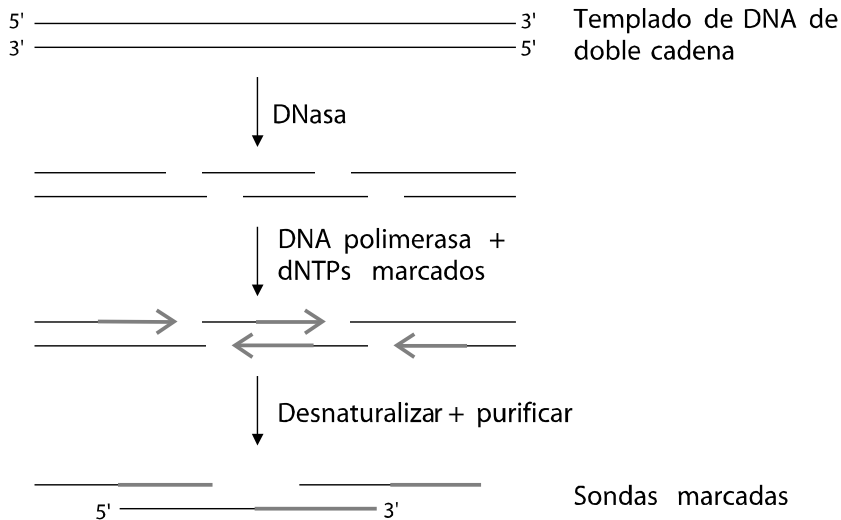


Figura 9.17. Marcación de sondas de DNA por el método nick de translación.

21. G.H. Keller y M.M. Manak, "DNA probes", Macmillan, New York, 1989. pp. 76-79.

El método de traslación de nick fue utilizado originalmente para incorporar nucleótidos marcados radioactivamente en las sondas de DNA. Un trabajo más reciente ha demostrado que los nucleótidos marcados con biotina se pueden incorporar también usando este método, obteniéndose sondas con una sensibilidad equivalente. Nucleótidos de uracilo y de adenina que se han marcado con biotina pueden observarse en la Figura 9.18.

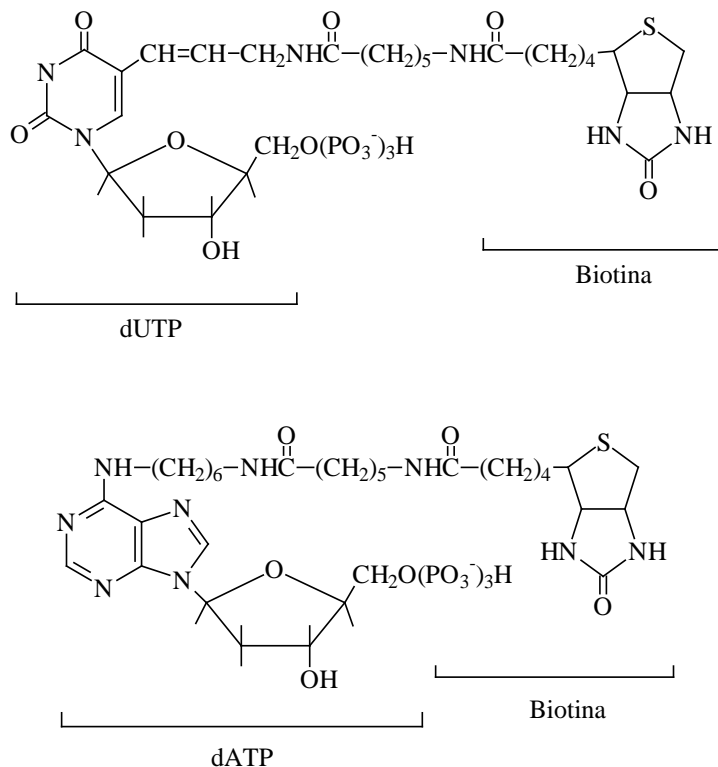


Figura 9.18. Biotina-11-dUTP y Biotina-14-dATP.

Por sí mismo, la biotina no es una marca perceptible. Se utiliza como marcador porque existe una reacción irreversible subsecuente con las proteínas avidina o estreptavidina ($K > 10^{12} \text{ M}^{-1}$) que se puede utilizar para la detección, si estas proteínas se han marcado con una enzima y se utiliza una tinción por actividad; en estas condiciones, la sensibilidad del método de detección es extremadamente elevada. La conjugación de estas proteínas con la fosfatasa alcalina, la peroxidasa y otras enzimas están disponibles comercialmente, y se utilizan a menudo para este propósito. La Figura 9.19 muestra una secuencia de un protocolo para la detección de secuencias específicas de DNA, utilizando electroforesis, Southern blotting, la hibridación con una sonda de DNA marcada con biotina, y la detección usando un conjugado de una enzima con estreptavidina y tinción por actividad.

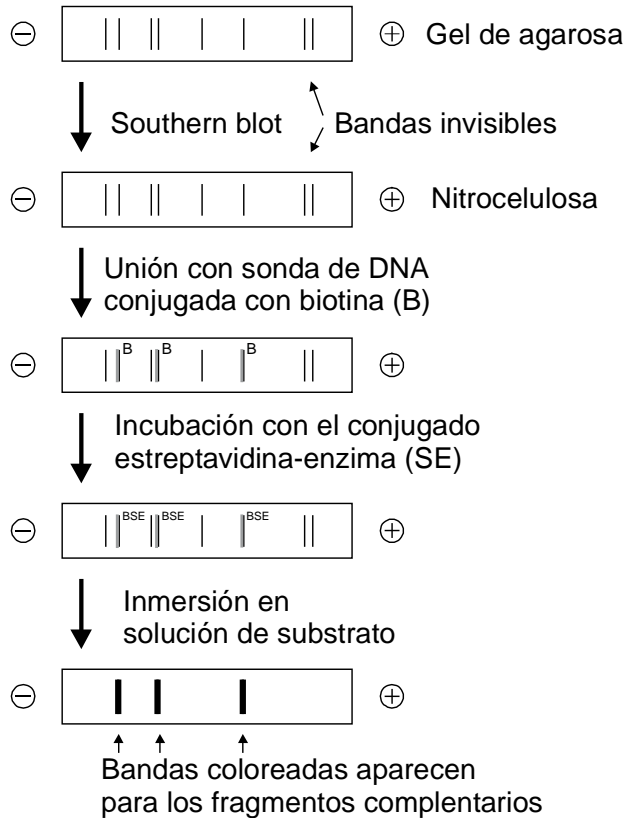


Figura 9.19. La detección de una secuencia de DNA en un patrón obtenido luego de una separación electroforética, utilizando una sonda de DNA marcada con biotina.

9.6 Lecturas sugeridas

- L.A. Lewis, “*CRC Handbook of Electrophoresis*”, CRC Press, Boca Raton, FL, 1980.
- R. Westermeier, “*Electrophoresis in Practice*”, Wiley-VCH, New York, 2001.
- G.J. Moody y J.G.R. Thomas, “*Practical Electrophoresis*”, Merrow, 1975.
- D.F. Keren, “*High Resolution Electrophoresis and Immunofixation*”, Butterworths, London, 1987.
- B.D. Hames y D. Rickwood, Eds., “*Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*”, Oxford University Press, New York, 1981.
- A. Chrambach, “*The Practice of Quantitative Gel Electrophoresis*”, VCH Publishers, Weinheim, Germany, 1985.

9.7 Problemas

1. Una mezcla de citocromo C y mioglobina deben ser separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida. El valor de sus pH isoelectricos (pI) son 9,6 y 7,2, y sus pesos moleculares son de 11,7 y 17,2 el kD, respectivamente. ¿En qué dirección emigrará cada proteína (hacia el ánodo o el cátodo) si la corrida se realiza al siguiente pH, (a) 6,0, y (b) 8,5?

2. Dos proteínas monoméricas, X e Y, con un peso molecular de 16,5 y 35,4 kD, respectivamente, fueron tratadas con SDS para separarlas mediante SDS-PAGE.

(a) ¿La muestra deberá aplicarse al extremo anódico o catódico del gel?

(b) ¿Cuál de las dos proteínas migrará más lejos del origen?

(c) Distancias de migración de 9,2 y 2,6 centímetros fueron medidas para dos proteínas estándares. Una proteína desconocida migró 5,2 centímetros a través del mismo gel después del tratamiento del SDS. ¿Cuál es el peso molecular de la proteína desconocida?

3. Una mezcla de proteínas de alto peso molecular y de DNA es separada por electroforesis en gel de agarosa. Elija una combinación de colorantes de la Tabla 9.1 que permitiría que las bandas de la proteína fueran distinguidas de las bandas de DNA, basado en su coloración diferencial.

4. ¿A qué pH aproximado se debería realizar un western blot, para transferir solamente las proteínas del problema 3 a una membrana de nitrocelulosa?

5. ¿Para detectar las posiciones de los fragmentos electroforéticamente separados de DNA, podría utilizarse bromuro de etidio o una sonda de DNA marcada con biotina (utilizada con un conjugado de avidina-enzima y una tinción por actividad). ¿Con cuál de estos métodos esperarías obtener información acerca de la posición de todos los fragmentos de DNA presentes en la muestra? ¿Cuál proporcionaría la información selectiva para los fragmentos de DNA que contienen una secuencia particular?

CAPÍTULO 10

APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS DE ZONA

10.1 Introducción

Este Capítulo describe algunos usos de los métodos y principios descritos en el Capítulo 9. Muchas variaciones de la electroforesis zonal han sido desarrolladas como herramientas específicas para la investigación y las pruebas de diagnóstico. Los ejemplos dados en este Capítulo, mientras que no pretende ser un listado completo, son representativo de la diversidad de usos de la electroforesis de zona. Consideraremos la determinación de la carga neta, composición y peso molecular de proteínas, la determinación del peso molecular de moléculas de DNA, la identificación de isoenzimas, la diagnosis de enfermedades hereditarias, los métodos de huella dactilar de DNA (DNA fingerprinting), secuenciación de DNA e inmunoelectroforesis.

10.2 Determinación de la carga neta de proteínas y peso molecular utilizando PAGE¹

Usando los principios descritos en el Capítulo 9, las proteínas formadas por varias subunidades se pueden separar según su peso molecular en geles de poliacrilamida bajo condiciones no-desnaturalizantes. Para ello, se preparan un número de geles teniendo %C constante y variando %T. La proteína desconocida y un número de proteínas estándares (de peso molecular conocido) son sometidas a electroforesis por separado en estos geles; un colorante (marcador de frente de corrida) de tamaño tal que no sea restringido por el gel es agregado previamente a cada muestra. Para cada proteína en cada gel, un valor de R_f se calcula como la distancia de migración de la proteína dividida por la distancia de migración del marcador. El R_f toma valores de entre cero y la unidad, a condición de que el colorante marcador del frente de corrida tenga una carga del mismo *signo* que la proteína. Cuando se han tabulado estos datos, un diagrama de Ferguson [$\log(R_f)$ versus %T] se construye para

1. D. Rodbard y A. Chrambach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **65**, 1970, 970-977.

cada proteína. El cociente neto de la carga (proteína:marcador) se obtiene del diagrama de Ferguson, como el antilogaritmo del valor de intercepción con el eje y (%T = 0). La pendiente negativa del diagrama de Ferguson se llama K_D , y es proporcional al peso molecular. Una curva de calibración de K_D versus peso molecular se prepara a partir de los datos obtenidos con las proteínas estándares, y el valor de K_D de la incógnita se utiliza con este diagrama de obtener el peso molecular de la proteína incógnita.

Esta técnica se ilustra con la proteína hemaglutinina. Una serie de once geles fueron preparados utilizando %C = 2, con %T variando desde 4 a 9. Los valores de R_f determinado luego de la electroforesis y tinción de los geles fueron utilizados para construir el diagrama de Ferguson que se observa en la Figura 10.1. La intercepción con el eje y de este diagrama permite obtener como resultado una relación carga neta para la hemaglutinina de 3,13 y un valor de K_D igual a 0,13379.

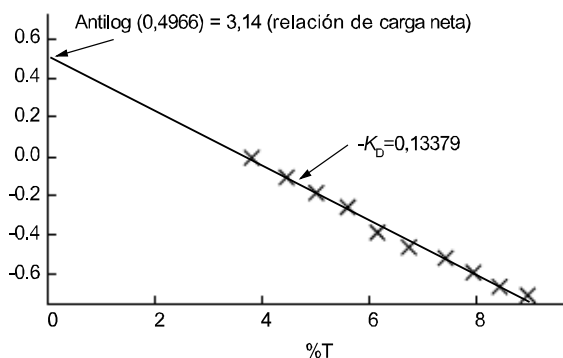


Figura 10.1. Grafico de Ferguson para hemaglutinina.

La Tabla 10.1 muestra los valores de K_D obtenidos utilizando los mismos geles para siete estándares de peso molecular conocido. Entonces puede construirse la curva de calibración utilizada para determinar el peso molecular de la hemaglutinina, valor que puede ser obtenido por la interpolación de esta curva, como se observa en la Figura 10.2.

Proteína	Peso molecular, kD	K_D
Quimotripsina	21,6	0,03868
Aconitasa	66	0,07201
Plasminógeno	81	0,08991
Lactoperoxidasa	93	0,09336
Inmunoglobulina G	160	0,12998
IgG dímero	320	0,25127
IgG trímero	480	0,31315
Hemaglutinina	Incógnita	0,13379

Tabla 10.1. Pendientes del grafico de Ferguson y pesos moleculares de las proteínas estándares.

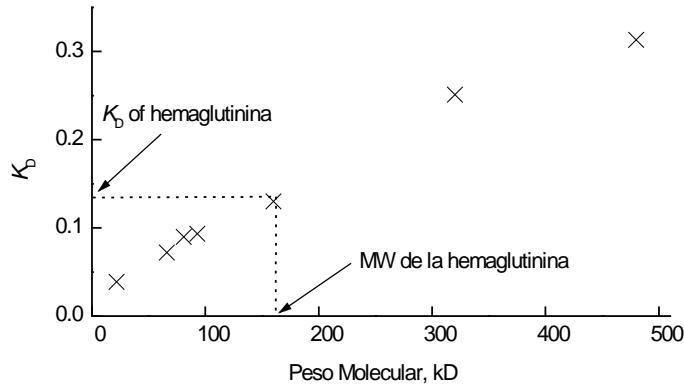


Figura 10.2. Curva de calibración para la determinación del peso molecular de la hemaglutinina. Reproducida, con permiso, de D. J. Holme y H. Peck, “*Analytical Biochemistry*”, Longman, New York, 1998. © Addison Wesley Longman Limited 1998.

Debe tenerse en cuenta que esta curva de calibración exhibe una región lineal hasta aquellos pesos moleculares que dan lugar a una migración muy pequeña en los geles de poliacrilamida. Los datos obtenidos para los estándares proteicos de muy elevado peso molecular tienden a presentar baja precisión, debido principalmente a la dificultad en medir distancias muy pequeñas de migración. El peso molecular de la hemaglutinina fue así determinado, obteniéndose un valor de 160 kD, que está dentro de la región lineal de la curva de calibración. Si la proteína desconocida tuviera un peso molecular superior a 300 kD, el experimento debería ser repetido usando una gama más baja de valores de %T y de una serie de proteínas estándares de peso molecular más alto. Esta técnica permite obtener valores de peso molecular que son exactos en el orden del 5%.

10.3 Determinación de la estructura cuaternaria de proteínas y el peso molecular de subunidades²

La estructura terciaria y cuaternaria en proteínas formadas por más de una molécula proteica es mantenida en parte por la presencia de los enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína. Cuando tal proteína se expone a un agente reductor tal como el mercaptoetanol o ditioneol, los enlaces disulfuro se convierten en grupos sulfhídricos, las subunidades se disocian y la estructura terciaria de las subunidades es alterada. En la presencia de dodecilsulfato de sodio

2. A. Chrambach, “*The practice of Quantitative Gel Electrophoresis*”, VCH Publishers, Deerfield Beach, FL, 1985. p. 177.

(SDS), tales subunidades de la proteína rinden especies con una carga negativa uniforme. Las proteínas se unen al SDS en una relación de 1,4 g SDS a 1 g de proteína, suprimiendo con eficacia cualquier carga nativa en la proteína; esta uniformidad en la relación carga / masa resulta en una migración electroforética desde el cátodo al ánodo, donde las distancias de migración dependerán solamente del tamaño de la cadena del polipéptido. El gel de SDS-poliacrilamida da lugar simplemente a una acción de tamizado molecular, que permite que las proteínas pequeñas migren rápidamente, y restringe la migración de las proteínas grandes. Gráficos del $\log(\text{masa molecular relativa})$ (RMM) versus la movilidad relativa (distancia de la migración) son lineales, y permiten la determinación de pesos moleculares desconocidos. Los datos que se presentan en la Figura 10.3 y la Tabla 10.2 fueron obtenidos para siete proteínas en un gel de poliácridamida al 5% que contiene 0,1% SDS, después de calentar las muestras en una solución conteniendo mercaptoetanol y SDS.³

Número	Proteína	RMM	\log_{10} RMM
1	Citocromo c (músculo)	11.700	4,068
2	Mioglobina (músculo esquelético equino)	17.200	4,236
3	IgG cadena liviana	23.500	4,371
4	Anhidrasa carbónica (bovina)	29.000	4,462
5	Ovoalbúmina	43.000	4,634
6	Albúmina (humana)	68.000	4,832
7	Transferrina (humana)	77.000	4,886

Tabla 10.2. Estándares proteicos utilizados para SDS-PAGE.³

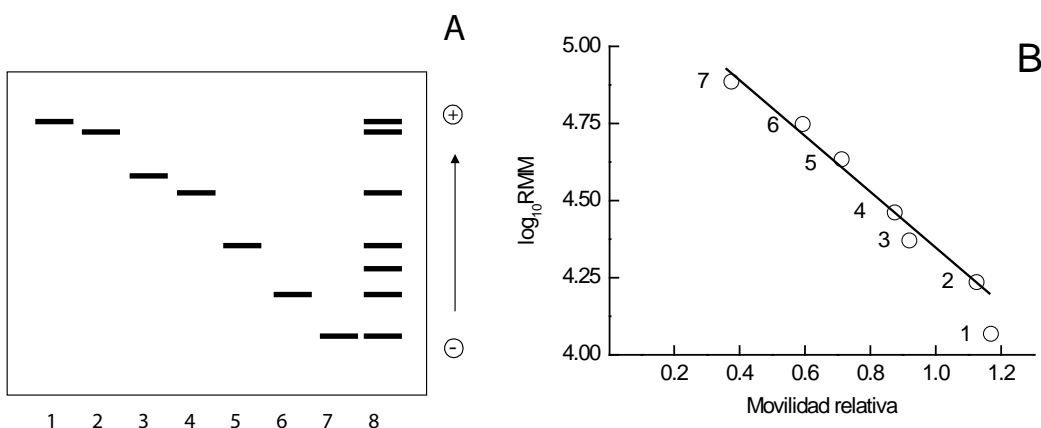


Figura 10.3. SDS-PAGE (A) y calibración en MW (B) para proteínas de la Tabla 10.2.³ Reproducida, con permiso, de D. J. Holme y H. Peck, “*Analytical Biochemistry*”, Longman, New York, 1998. © Addison Wesley Longman Limited 1998.

3 D. J. Holme y H. Peck, “*Analytical Biochemistry*”, 3rd Ed., Longman, New York, 1998, pp. 400-402.

10.4 Peso molecular de DNA utilizando electroforesis en Geles de Agarosa⁴

Los tamaños mayores del poro de los geles de agarosa permiten que el efecto de tamizado molecular sea empleado para la determinación del peso molecular de DNA. Debido a los grupos fosfato cargados negativamente de la cadena principal de estas biomoléculas, el DNA nativo posee una relación carga /masa constante. Sin embargo, la relación entre el peso molecular y la movilidad no es tan directa para el DNA como lo son las determinaciones del MW de proteínas utilizando los métodos de SDS-PAGE. La Figura 10.4 muestra el efecto de la longitud de cadenas de DNA (en pares de bases, n) versus movilidad, para DNA lineal y circular. Estos diagramas demuestran la tendencia general prevista de que la movilidad disminuye con el aumento de peso molecular, así como que la movilidad disminuye con el aumento de contenido de agarosa (dado que el tamaño del poro disminuye). Sin embargo, el diagrama semi-logarítmico es no lineal, especialmente en las concentraciones más altas de agarosa, indicando que el modelo de tamizado simple no se aplica estrictamente.

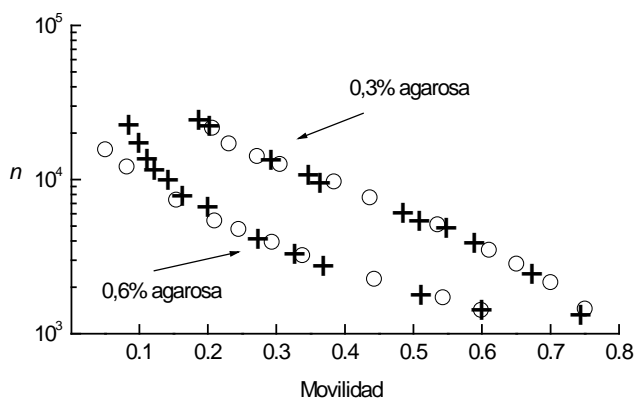


Figura 10.4. Movilidad para DNA lineal (+) y circular, relajado (o) al atravesar geles de agarosa de 0,3 o 0,6%, a 0,3 V/cm por 30 o 40 horas, respectivamente, en 0,1 M Tris, 0,09 M ácido bórico y 1 mM EDTA.

El comportamiento de la movilidad del DNA se ha modelado utilizando polímeros de poliestirensulfonato.⁵ Se ha demostrado que la movilidad depende del grado de “*enredo*” (entanglement) del polímero en el gel. Solamente los polímeros débilmente enredados responden al comportamiento de tamizado previsto, que da a lugar a diagramas lineales

4. N.C. Stellwagen, *Biochemistry* **22**, 1983, 6180-6185.

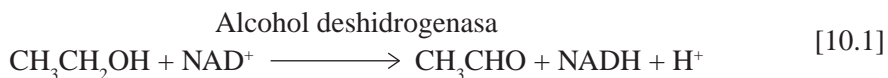
5. D.L. Smisek y D.A. Hoagland, *Science* **248**, 1990, 1221-1223.

de calibración. Esta diferencia fundamental en el comportamiento de movilidad entre las proteínas y el DNA es un resultado de las aproximaciones que se aplican a la forma espacial de las proteínas, esférico, o enrolladas al azar (random-coil), aproximación que se sostiene generalmente para las proteínas pero no para los polímeros de ácidos nucleicos. Para las determinaciones del MW de DNA, la concentración de agarosa debe mantenerse en un valor mínimo, o bien una gran cantidad de estándares de MW se deben emplear para definir la forma de la curva de calibración.

10.5 Identificación de isoenzimas

Los isoenzimas son enzimas de diversas especies, o producidas por diversos mecanismos dentro de una misma especie, que catalizan reacciones idénticas. Las isoenzimas se diferencian a menudo por solamente uno o algunos residuos aminoacídicos, y suelen tener pesos moleculares muy similares. En algunos casos, los residuos cargados de los aminoácidos en una isoenzima (por ejemplo lisina, arginina, aspartato, glutamato) pueden ser substituidos por los residuos sin carga de otros aminoácidos en otra isoenzima, dando este tipo de substitución lugar a diversas cargas netas a un pH dado, y a diversos valores de pI para las distintas isoenzimas.

Por ejemplo, la alcohol deshidrogenasa humana existe en *más de veinte formas*.⁶ Estas isoenzimas son todas dímeros, y todas tienen pesos moleculares de aproximadamente 80 kD, o cerca de 40 kD por subunidad. Las diversas subunidades se han llamado α , β , γ_1 , γ_2 , π y X. Todas las isoenzimas catalizan la conversión del etanol al acetaldehído según la Eq. 10.1:



Las isoenzimas humanas de la alcohol deshidrogenasa se han dividido en tres clases. Las isoenzimas de la clase I contienen subunidades α , β , γ_1 y γ_2 , son catiónicas a pH neutral, y son inhibidas fuertemente por compuestos de pirazol substituidos. Las isoenzimas de la clase II contienen la subunidad π , son catiónicas a pH neutral, y son relativamente insensibles a la inhibición por compuestos de pirazol. Las isoenzimas de la clase III contienen la subunidad X, son aniónicos a pH neutral y son insensibles a los inhibidores de pirazol.

6. W.F. Bosron, T.-K. Li y B.L. Vallee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 1979, 1549-1555.

7. W.M. Keung, C.C. Ditlow y B.L. Vallee, *Anal. Biochem.* **151**, 1985, 92-96.

Se han estudiado las clases I y II utilizando PAGE, con urea 7 M en la solución de muestra y el gel, y con ditioneitol 10 mM en la muestra.⁷ La urea interfiere con las uniones por puente de hidrógeno despliega la proteína, mientras que el DTT reduce los enlaces disulfuro. Debido a que las clases I y II de esta isoenzima son catiónicas a pH neutral, las muestras se introducen en el ánodo y migrarán hacia el cátodo. Mientras que las masas de las diversas subunidades son prácticamente idénticas, sus cargas netas son perceptiblemente diferentes, y ésta afecta los cocientes carga / masa que controlan las movilidades electroforéticas. La Figura 10.5 muestra los geles en los que se han realizado experimentos electroforéticos de una serie de isoenzimas de la alcohol deshidrogenasa, clase I y II, después de ser teñidos.

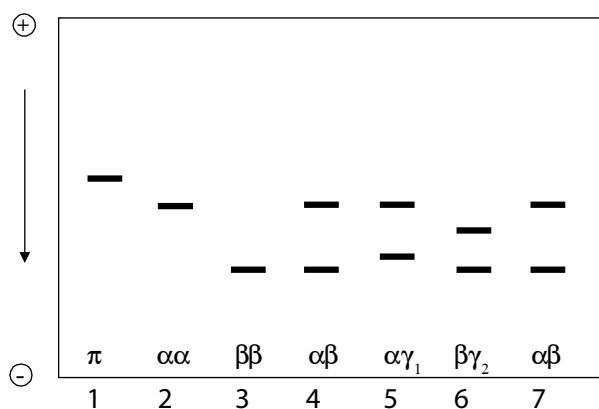


Figura 10.5. Separación electroforética de las subunidades de isoenzimas purificadas en presencia de urea 7 M. La calle 1 contiene ADH clase II, formada solamente por unidades tipo π , mientras que las isoenzimas de la clase I, en las calles 2-7, tienen una composición de subunidades según lo indicado en cada carril.

10.6 Diagnóstico de enfermedades genéticas (heredadas)

Las técnicas de diagnóstico de DNA utilizan generalmente como analito DNA que se ha aislado de linfocitos sanguíneos (glóbulos blancos). Este DNA de alto peso molecular se puede digerir utilizando *enzimas de restricción* (también llamadas endonucleasas) para rendir fragmentos más cortos, de doble cadena. Los fragmentos se separan en geles de agarosa, luego son transferidos a membranas de nylon o nitrocelulosa, y examinado para la secuencia del interés utilizando sondas de DNA marcadas.

Las enzimas de restricción reconocen ciertas regiones, o secuencias, del DNA. Estas secuencias son relativamente cortas, y se encuentran en múltiples sitios del genoma nativo. Algunos ejemplos de las enzimas de restricción y de sus sitios de reconocimiento se destacan

en la Tabla 10.3. El corte del DNA doble cadena ocurre donde las rayas verticales (/) se muestran en la secuencia de reconocimiento. Los nombres de las enzimas de restricción se derivan de la especie de la cual se aíslan (por ejemplo, Eco es *Escherichia coli*) y contienen números para su identificación inequívoca.

Enzima	Sitio de Reconocimiento
Sca I	5'-AGT/ACT-3' 3'-TCA/TGA-5'
Hind III	5'-A/AGCTT-3' 3'-TTCGA/A-5'
Eco RI	5'-G/AATTC-3' 3'-CTTAA/G-5'
Alu I	5'-AG/CT-3' 3'-TC/GA-5'

Tabla 10.3. Ejemplos de las endonucleasas (enzimas de restricción) y de sus sitios de reconocimiento.

El tamaño del sitio del reconocimiento de una endonucleasa puede variar entre 4 y 9 (o más) pares de bases. Un sitio pequeño conduce a múltiples cortes en la cadena de DNA y a muchos fragmentos, puesto que esta región pequeña es estadísticamente más probable de que se encuentre muchas veces, mientras que regiones de reconocimiento más grandes conducen a pocos fragmentos.

La anemia falciforme (Sickle-cell anemia) es un desorden genético recesivo que resulta de una substitución de una única base (una mutación puntual), en el gene que codifica para la secuencia de la β -globina de la hemoglobina humana, tetrámerica. Esta mutación puntual da lugar a la substitución de un aminoácido en el polipéptido β -globina, y conduce a una disminución en la solubilidad de la molécula de hemoglobina en su forma no-oxigenada. El DNA aislado de los glóbulos blancos de pacientes se analiza usando la enzima de restricción Mst II para la digestión, seguida por electroforesis en gel de agarosa e hibridación con una sonda de prueba de DNA marcada con ^{32}P , donde la secuencia de la sonda de prueba contiene la secuencia completa que codifica para la β -globina.⁸ El DNA de individuos con anemia falciforme no tiene un sitio de corte para Mst II, (sitio que está presente en los individuos normales), lo que da lugar a la producción de menos fragmentos de DNA, así como la falta de algunos tamaños de fragmento normales. La Figura 10.6 muestra el autoradiograma de los patrones obtenidos por la separación utilizando este método. Observe que solamente los fragmentos que contienen la secuencia de codificación de la β -globina están representados.

8. G.H. Keller y M.M. Manak, "DNA Probes", Macmillan (Stockton Press), New York, 1993. p. 16.

Figura 10.6. Detección del alelo de la β -globina, responsable de la anemia falciforme.⁸ Reproducida, con permiso, de G. H. Keller y M. M. Manak, “*DNA Probes*”, Macmillan (Stockton Press), New York, 1993. © Macmillan Publishers Ltd. 1993.

En la Figura 10.6 puede observarse que las diferencias en las longitudes de los fragmentos de restricción ocurren en la región 1,15-1,35 kilobases del patrón de la separación. Después de la digestión cuantitativa del DNA por la enzima de restricción Mst II, el DNA normal (beta-A) rinde un fragmento 1,15 kilobases. Debido a que uno de los sitios de restricción está ausente en el gene relacionado con la anemia falciforme (beta-S), esta región del DNA no es cortada, y el fragmento que resulta es más largo, de 1,35 kilobases. Los patrones obtenidos para el DNA de la madre y el padre muestran bandas debidas al gen normal y al de la anemia falciforme, mientras que un niño afectado exhibe solamente la banda de la anemia falciforme en 1,35 kilobases. Los resultados de esta prueba demuestran claramente que el feto sufrirá de anemia falciforme.

10.7 Huella dactilar de DNA (DNA Fingerprinting) y polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción⁹

Los métodos de la *huella dactilar de DNA* se utilizan en los laboratorios forenses para la identificación de individuos, y en los laboratorios clínicos para la diagnosis de las enfermedades genéticas. Estos métodos emplean enzimas de restricción que han sido seleccionadas cuidadosamente experimentalmente por sus particulares sitios de corte. La utilización de cócteles de distintas enzimas de restricción en los métodos forenses permite producir muchos fragmentos, de tal manera de que las diferencias en las secuencias de DNA que ocurren normalmente entre los individuos originen muchas diferencias en las longitudes de los fragmentos producidos. Los métodos de diagnóstico emplean las enzimas de restricción que reconocen una secuencia crítica donde las mutaciones de esta secuencia se sabe están asociadas con determinada enfermedad.

La frase *polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción* (RFLP) se refiere a la variedad de longitudes de los fragmentos obtenidos luego de la digestión del DNA con las endonucleasas. Las varias longitudes pueden dar lugar a distintos patrones electroforéticos durante la separación, que son como huellas digitales porque son únicas de un individuo. Los polimorfismos simples, tales como el que puede verse en la Figura 10.6 con el sitio de Mst II faltante en pacientes con anemia falciforme, pueden ser empleados para el diagnóstico. La Figura 10.7 ilustra los principios de los métodos de RFLP.

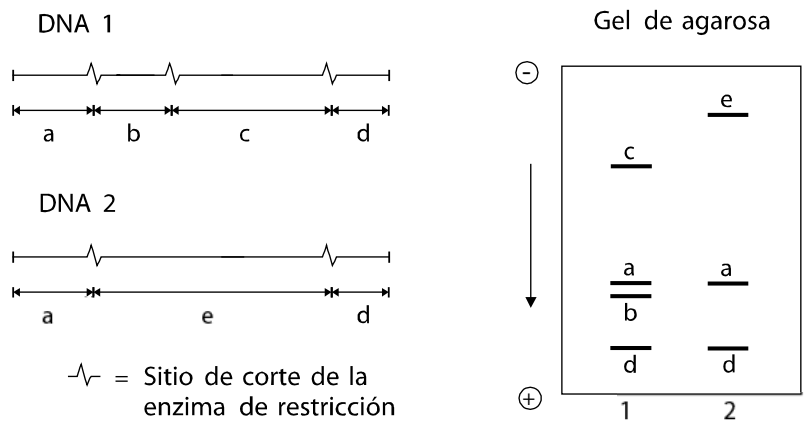


Figura 10.7. Polimorfismo del tamaño de la longitud de los fragmentos de restricción para la identificación del DNA.

Si el número total de los fragmentos que resultan de la digestión cuantitativa es relativamente pequeño, el paso de la detección puede implicar una tinción simple y directa con

9. L.T. Kirby, "DNA Fingerprinting: An Introduction", Macmillan (Stockton Press), New York, 1990.

bromuro de etidium, sin necesidad de realizar un Southern blot. Sin embargo, si se producen muchos fragmentos, deberá realizarse un Southern blot seguido por detección mediante la hibridación con sondas de DNA marcadas. Las sondas de prueba se eligen de tal manera de que hibriden con muchos fragmentos, para visualizar una porción significativa del patrón de la separación, de tal manera de que las diferencias individuales en el DNA puedan observarse fácilmente. La Figura 10.8 ilustra la huella dactilar de DNA para una prueba de paternidad. El patrón de la separación que resulta del DNA del niño se puede ver que contiene bandas tanto presentes en el DNA de la madre como del padre, mientras que una banda nueva en el DNA del niño sugiere la posibilidad de una nueva mutación. El reactivo crítico en métodos de RFLP es la enzima de la restricción (o cóctel de enzimas), que debe producir longitudes de fragmento muy distintas para muestras individuales de DNA.

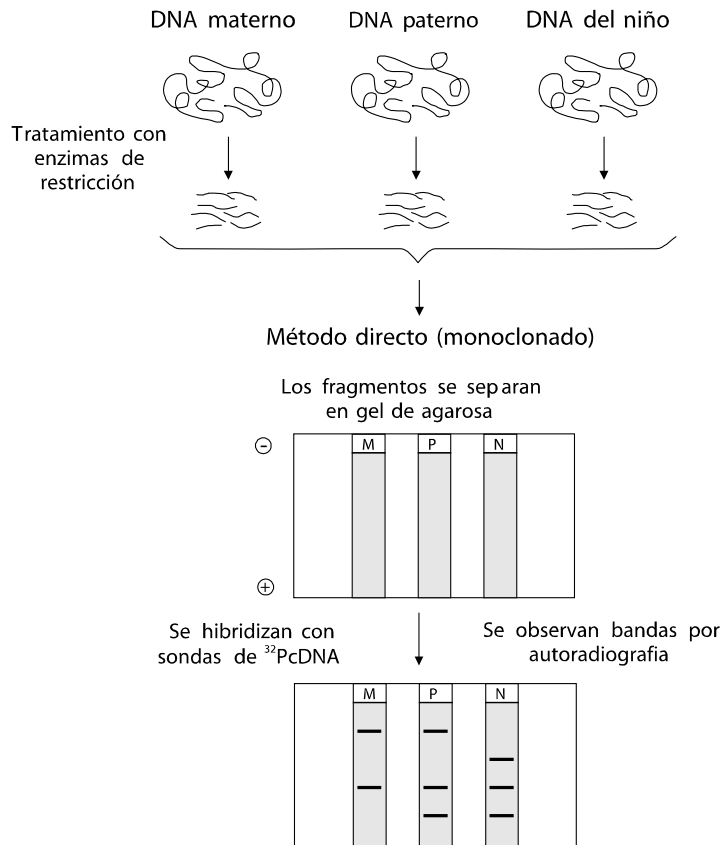


Figura 10.8. RFLP para la prueba de paternidad. El paso 1 (arriba) es el aislamiento y el corte del DNA nativo en fragmentos de restricción; el paso 2 (centro) es la separación electroforética en gel de agarosa, que produce un borronado donde las bandas individuales son indistinguibles; y el paso 3 (abajo) demuestra el patrón obtenido después de realizar un Southern blot, hibridación con sondas de prueba marcadas con ³²P, y posterior autorradiografía.

Los métodos de diagnóstico basados en RFLP emplean el DNA que puede obtenerse fácilmente de los glóbulos blancos de las muestras de sangre de los pacientes. Por otro lado, los métodos forenses utilizan muestras en las que la cantidad de DNA es imprevisible (generalmente baja); además, si la muestra de DNA es antigua y se ha expuesto a la luz del sol (radiación UV), el DNA puede encontrarse como fragmentos más bien que como cromosomas intactos. En tales casos, el DNA disponible se amplifica, aumentando su concentración, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).¹⁰ La tecnología del PCR ha revolucionado el análisis del DNA, y ha hecho tales pruebas forenses de uso general factibles.

La amplificación del DNA por PCR utiliza la repetición de un ciclo termal entre tres temperaturas para (a) disociar la cadena de DNA en filamentos simples, (b) asociación de los primers (c) biosíntesis de la nueva cadena de DNA con la enzima DNA polimerasa. Una solución que contiene la cadena doble de DNA (el analito), un exceso de los oligonucleótidos seleccionados (primers), una DNA polimerasa termoestable (se utiliza la Taq DNA polimerasa; esta se aísla de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*), y un exceso de desoxinucleótidos trifosfatados, y se completan ciclos termales como el siguiente. A temperaturas de entre el 93-94°C, el DNA a ser amplificado se desnaturaliza en filamentos simples. La temperatura se cambia rápidamente a entre 37-72°C, en la que los primers se unen al DNA analito (la mejor temperatura se determina experimentalmente para un sistema particular de primers); a esta temperatura los primers se unen por complementariedad con las moléculas de DNA, formando una “doble cadena” en sitios específicos de la molécula analito. Los primers son cadenas simples de DNA, usualmente de entre 20-26 bases en longitud y con un contenido GC de entre 40-60%. Dos primers son necesarios para la amplificación por PCR, cada uno de ellos se une a una cadena de DNA, cerca del extremo 3' - de la región de interés (a ser amplificada). Después del paso de unión del primer (annealing step), la temperatura se cambia rápidamente a 70-72°C, donde la DNA polimerasa extiende secuencialmente los primers un nucleótido a la vez, moviéndose hacia los extremos 5' - de la región de interés. Los nucleótidos que se incorporan en las nuevas cadenas dobles son complementarios en secuencia con las cadenas del analito. Después de este ciclo, una copia de cada molécula del DNA analito ha sido producida.

Mediante la repetición de los ciclos termales, se logra la obtención de copias de copias, y una amplificación exponencial de la concentración del DNA. En principio, el número de las copias producidas es igual a $2^n - 1$, donde n es el número de ciclos termales completos usados. La mayoría de los protocolos de PCR especifican más de 25 ciclos. En la práctica, la amplificación es algo menos que la predicha, debido a la extensión incompleta ocasionada por la unión de los primers a otros sitios en la molécula de DNA. El tamaño de la región amplificada es generalmente de 100-400 bases en longitud. La Figura 10.9 muestra una representación esquemática de la amplificación por PCR.

10. W.C. Timmer y J.M. Villalobos, *J. Chem. Educ.* **70**, 1993, 273-280.

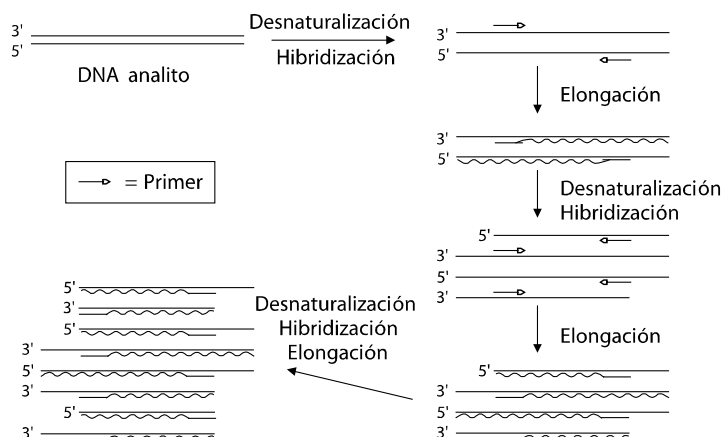


Figura 10.9. Representación esquemática de los primeros tres ciclos de la amplificación por PCR.

El DNA utilizado como templado puede ser cualquier fragmento de DNA de doble cadena que contenga la secuencia de interés, cuyo rango en tamaño se extiende desde el tamaño del producto de PCR en sí mismo hasta un cromosoma humano. Las líneas onduladas indican el DNA recientemente sintetizado; observe que el templado está incorporado en este filamento nuevo y define el extremo 5' del producto. Las líneas rectas indican los filamentos del templado que son copiados.

10.8 Secuenciación del DNA con el método de Maxam-Gilbert¹¹

La determinación de la secuencia de una muestra desconocida de DNA puede realizarse mediante métodos basados en reacciones enzimáticas (el método del dideoxi) o en reacciones químicas (el método de Maxam-Gilbert), que rinden una serie de fragmentos perceptibles que se diferencian en longitud por una única base. El método de Maxam-Gilbert utiliza cuatro reacciones químicas que cortan selectivamente el DNA en los residuos de dG, dC, dG+dA y dC+dT, y los productos de estas reacciones de corte parciales son sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida. El paso inicial en el protocolo de secuenciación implica el marcado del DNA de cadena simple con ³²P en el extremo 5' o en el 3' (pero no en ambos). El DNA marcado es entonces dividido en cuatro porciones, y sometido a cuatro reacciones de corte separadas. Cada reacción da lugar al rompimiento parcial del fragmento en las bases definidas por la naturaleza de la reacción química, y luego de realizar un PAGE, la secuencia del DNA puede ser leída en el patrón de bandas de la autoradiografía.

Por ejemplo, dado un fragmento inicial marcado en el extremo 5', que tienen la secuencia ³²P-GCTGCTAGGTGCCGAGC, el corte parcial en (y el retiro de) los residuos de G rendirán los siguientes fragmentos *detectables*:

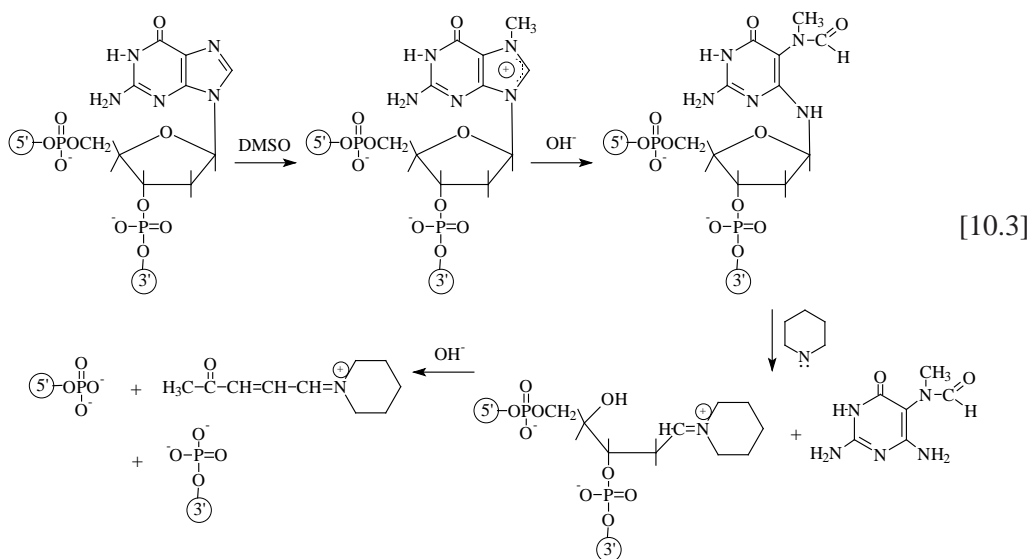
11. A.M. Maxam y W. Gilbert, *Methods Enzymol.* **65**, 1980, 449-560.

$^{32}\text{P-GCTGCTAGGTGCCGAGC}$ ^{32}P $^{32}\text{P-GCT}$ $^{32}\text{P-GCTGCTA}$ $^{32}\text{P-GCTGCTAG}$ $^{32}\text{P-GCTGCTAGGT}$ $^{32}\text{P-GCTGCTAGGTGCC}$ $^{32}\text{P-GCTGCTAGGTGCCGA}$

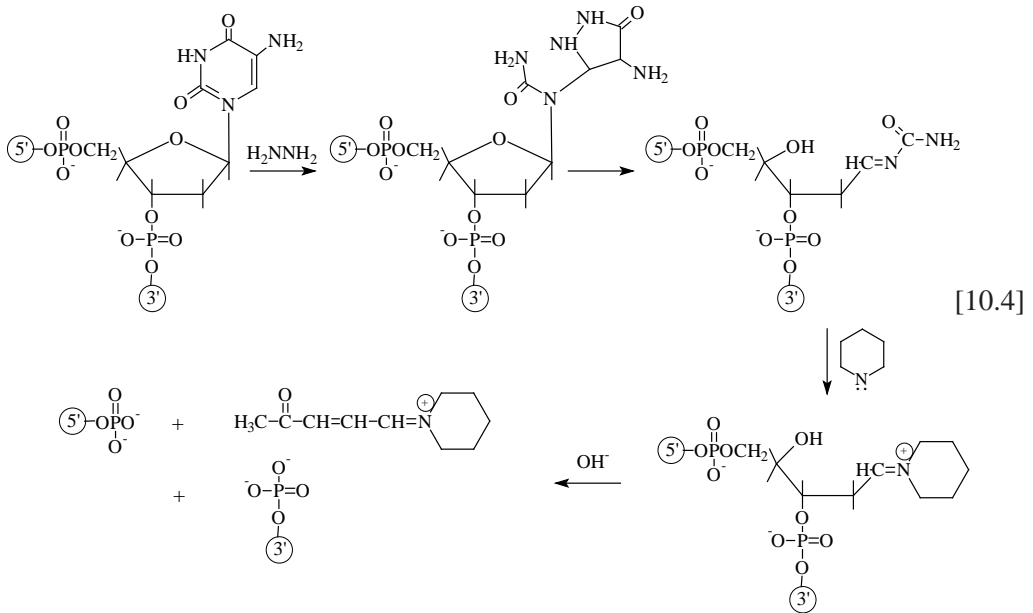
[10.2]

Muchos otros fragmentos también serán producidos, pero no serán detectables, puesto que carecen del marcador ^{32}P . La electroforesis de esta mezcla producida en un gel de poli-acrilamida rendirá, por lo tanto, ocho bandas, una para el fragmento inicial y siete para los productos de la reacción. El fragmento inicial estará más cercano al origen (el extremo catódico del gel), mientras que el fragmento más corto emigrará más lejos del cátodo. Es muy importante que las reacciones de corte sean interrumpidas antes de su finalización. Si ocurre esto, sólo los fragmentos más cortos estarán presentes en cada uno de los cuatro productos de la reacción. Ahora consideraremos las cuatro reacciones utilizadas.

La Reacción G: Esta reacción utiliza el dimetilsulfoxido (DMSO), hidróxido y piperidina para el corte selectivo del DNA en los residuos de deoxiguanosina, según se observa en la Reacción 10.3, abajo. El DMSO metila a la guanina en la posición N7, haciéndola susceptible al ataque nucleofílico en la posición C8 por el hidróxido, que abre el anillo. Estas dos reacciones también ocurren con adenina, siendo el paso siguiente el que es selectivo para la guanina. En la presencia de piperidina, la guanina (pero no la adenina), es desplazada, y la unidad de deoxiribosa es eliminada de la cadena. Esto rinde dos fragmentos de DNA, que tendrán grupos fosfato presentes donde estuvieron unidas al residuo del azúcar eliminado.



La Reacción C: La reacción C utiliza la hidrazina, la piperazina y el hidróxido para eliminar selectivamente residuos de dC de la cadena simple de DNA, según se observa en la Reacción 10.4. La hidrazina ataca la citosina en las posiciones C4 y C6, abriendo el anillo de pirimidina. Este producto entonces se vuelve a ciclar en un nuevo anillo de 5 átomos. La hidrazina no atacará residuos de timidina si NaCl 1 M está presente en el medio. Una reacción adicional con la hidrazina libera el anillo, dejando el residuo del azúcar en la cadena del DNA como hidrazona. La piperidina reaccionará con esta hidrazona, y en presencia de hidróxido, el residuo del azúcar es removido, dejando dos fragmentos que se encuentran fosforilados como en la reacción de G.



Las reacciones de G y de C son específicas para estas bases. Las dos otras reacciones necesarias para la secuenciación resultan en la ruptura de residuos de G y A, y en los residuos C y T, respectivamente.

La Reacción G+A: En esta reacción, medio ácido es utilizado para debilitar el enlace glucosídico mediante su protonación (en lugar de la metilación que ocurre en la reacción G) en la posición N7 de ambos, A y G. Esta forma protonada es susceptible al desplazamiento por la piperidina, que entonces ocurre según se observa en la Reacción 10.3.

La Reacción C+T: La reacción C+T se realiza bajo condiciones idénticas a la reacción de C, excepto que el NaCl 1 M usado en la reacción de C está ausente. Bajo estas condiciones, la cadena de DNA se cortará en los residuos de C y T. Por ejemplo, los fragmentos esperados para el corte del fragmento ^{32}P -ACTGTAGC, marcado en el extremo 5' para cada reacción se observan en la Tabla 10.4 abajo:

G	G+A	C+T	C
³² P-ACT	³² P	³² P-A	³² P-A
³² P-ACTGTA	³² P-ACT	³² P-AC	³² P-ACTGTAG
	³² P-ACTGT	³² P-ACTG	
	³² P-ACTGTA	³² P-ACTGTAG	

Tabla 10.4. Fragmentos marcados esperados luego del corte del fragmento ³²P-ACTGTAGC usando el método de secuenciación de Maxam-Gilbert.

Puede observarse en esta Tabla que todos los fragmentos que resultan de la reacción para G también estarán presentes en el producto de la reacción G+A, y, semejantemente, que todos los fragmentos que resultan de la reacción de C están también presentes en el producto de la reacción C+T. Estas mezclas del producto obtenido son sometidas a electroforesis en calles separadas en un gel plano de poliacrilamida, donde son separados de acuerdo a su tamaño, y la autorradiografía entonces revela el patrón demostrado en la Figura 10.10.

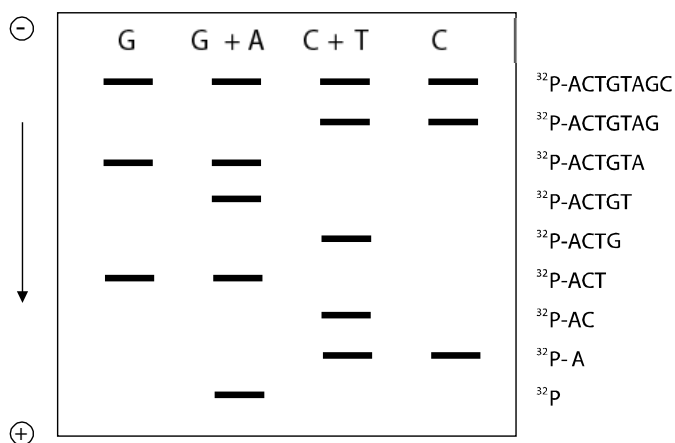


Figura 10.10. Autorradiograma de un gel de secuenciación de DNA obtenido después de las reacciones de Maxam-Gilbert para el fragmento ³²P-ACTGTAGC.

Para leer la secuencia del autorradiograma, recordamos que los fragmentos más pequeños migran más, alejándose más del cátodo y hacia el ánodo. Además, todas las calles deben tener una banda idéntica más cercana al origen que resulta de la cadena original, sin haber reaccionado; si esta banda está ausente, indica que las reacciones han procedido por demasiado tiempo, y se encuentran en o cerca de ser completas. Puesto que el fragmento más pequeño se sabe es el marcador radioactivo ³²P, y puesto que esta banda ocurre en la calle G+A, sabemos que la base más cercana al marcador debe ser A. La segunda banda más alejada del punto de siembra se observa en la calle C+T y en la calle C, de modo que la segunda base debe ser

una C. La tercera banda ocurre solamente en la calle C+T, y es por lo tanto un residuo de T. Ahora hemos ordenado las primeras tres bases, como ^{32}P -ACT. Continuando de este modo, la secuencia entera del fragmento se lee fácilmente en el gel de la secuenciación.

Geles de poliacrilamida tan largos como un metro han sido utilizados para permitir que la secuenciación de fragmentos de DNA de 600 bases puedan ser leídos en un solo gel.¹² Sin embargo, más a menudo se utilizan varios geles. Según se puede observar en la Figura 10.11, por ejemplo, un gel con hasta 20%T se utiliza para fragmentos de entre 0-150 bases, un gel 6%T para 140-300 bases, y un gel 4%T para fragmentos de entre 290-600 bases y más. Es necesario incluir una región de solapamiento entre un gel y el siguiente, para asegurarse de que todos los fragmentos hayan sido detectados.

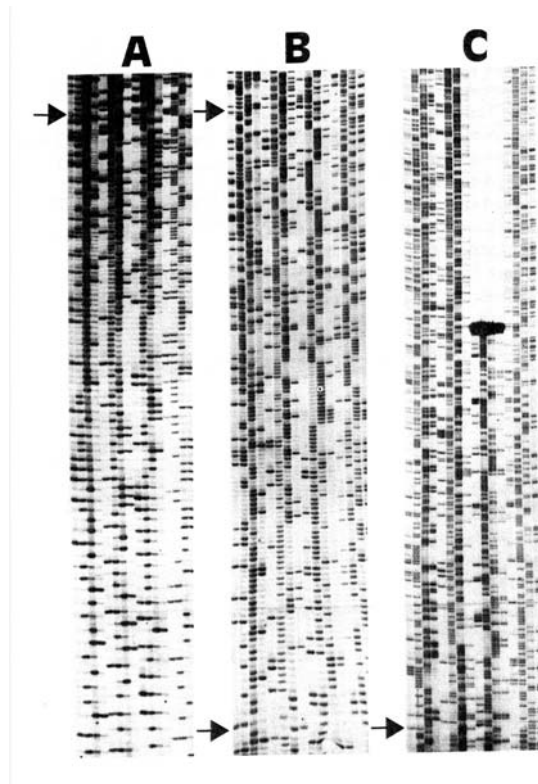


Figura 10.11. Autoradiogramas de tres geles de secuenciación de un metro, A=16%T, B=6%T, y C=4%T. Cada gel tiene dieciséis calles, conteniendo los cuatro productos de la reacción, en el siguiente orden (de izquierda a derecha) G, G+A, C+T, C, en cada gel se corren cuatro muestras de DNA. Las flechas indican puntos de cruce desde un gel al siguiente. Reproducida, con permiso, de R.F Barker in “*Nucleic Acids Sequencing: A Practical Approach*”, C. J. Howe and E. S. Ward, Eds., Oxford University Press, New York, 1989. © IRL Press at Oxford University Press 1989.

12. R.F. Barker en “*Nucleic Acids Sequencing: A Practical Approach*”, C.J. Howe and E.S. Ward, Eds., Oxford University Press, New York, 1989. p. 133.

10.9 Inmunoelectroforesis¹³

Las interacciones de unión entre antígeno y anticuerpo pueden ser inducidas después de que el patrón obtenido por una separación electroforética sea transferido (blotting) desde el gel sobre una membrana, en una técnica llamada inmunoblotting; estas interacciones también pueden realizarse directamente sobre los geles usados para la electroforesis. Los métodos inmunoelectroforéticos se utilizan para la identificación y la cuantificación de antígenos.

La técnica de inmunoblotting se realiza después de un western blotting de las proteínas sobre una membrana. La membrana con las proteínas unidas se incuba en una solución que contiene un antisuero policlonal o un anticuerpo monoclonal, y después es lavado. Este es el paso primario donde se identifica el antígeno de interés con la alta selectividad inherente a la interacción entre antígeno y anticuerpo. Los pasos subsiguientes de marcado, por ejemplo con un anti-IgG marcado enzimáticamente, seguido de una tinción por actividad, permiten la detección del anticuerpo unido selectivamente al antígeno en la membrana. Para el paso primario de unión, los anticuerpos monoclonales son preferidos respecto a los policlonales, debido a que la homogeneidad de los epítopes (un único epítopo), y por lo tanto su elevada selectividad reduce las interferencias que dan lugar a la detección de proteínas que no son el analito. Si se utiliza antisuero policlonal, todos los anticuerpos presentes deben ser considerados. Un “buen” antisuero contiene 6-7 mg/mL de inmunoglobulinas, y de éstas, 20-30% son los llamados anticuerpos específicos, que están dirigidos contra el agente inmunológico. El 70-80% restante de los anticuerpos es inaplicable al antígeno del interés, y se dirige contra agentes inmunológicos ambientales tales como microorganismos y componentes de alimentos así como contra impurezas en el agente inmunológico inyectado. La afinidad de la interacción de la unión primaria es a menudo perceptiblemente más baja en métodos inmunoelectroforéticos que en inmunoensayos típicos tales como el ELISA. Esto es un resultado de la desnaturalización del antígeno en el gel, y es particularmente apreciable en separaciones SDS-PAGE.

La Figura 10.12 muestra algunos ejemplos de la detección de proteínas con anticuerpos policlonales y monoclonales.¹⁴ Se observa un elevado número de bandas en el inmunoblot realizado con policlonales, y el hecho de que el anticuerpo monoclonal parece interactuar con un epítopo diferente que la mayoría de los anticuerpos en la mezcla del policlonal, puesto que la banda visualizada en el inmunoblot monoclonal es apenas visible en el inmunoblot realizado con policlonales.

13. J. Renart, J. Reiser y G.R. Stark, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1979, 3116-3120.

14. K.E. Johansson en “*Handbook of Immunoblotting of Proteins*”, O.J. Bjerrum y N.H.H. Heegard, Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1988. Vol. 1, pp. 159-165.



Figura 10.12. Inmunoblots de antígenos de *M. hyorhina*.¹⁴ Calle 1: proteínas marcadores; calle 2: colorante Coomassie blue; calle 3: inmunoblot con antisuero policlonal; línea 4: inmunoblot con antisuero monoclonal. Reproducida, con permiso, de K. E. Johansson en “*Handbook of Immunoblotting of Proteins*”, O. J. Bjerrum y N. H. H. Heegaard, Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1988. © 1988 by CRC Press, Inc

La Figura 10.13 muestra una comparación de diversas técnicas de marcado, después de que un anticuerpo monoclonal de ratón idéntico fuera utilizado en el paso primario del inmunoblot.¹⁵ La calle A muestra el método indirecto de la inmunoperoxidasa, por el que el anticuerpo monoclonal primario es detectado utilizando un anticuerpo anti-IgG de ratón producido en cabra, conjugado con peroxidasa, seguido de un tñido por actividad de peroxidasa. La calle B muestra el método de la peroxidasa anti-peroxidasa, en el que el anticuerpo anti-IgG de ratón producido en conejo es ligado al monoclonal de ratón, y un anticuerpo anti-IgG de conejo, con sus dos sitios de unión, es posicionado como sándwich entre el anti-IgG de ratón proveniente de conejo y el complejo peroxidasa: anti-peroxidasa de conejo en la relación 2:1. Finalmente, la calle C muestra la detección utilizando un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con biotina, seguido de por un conjugado streptavidina-peroxidasa, que es tñido por actividad. Las calles A y C indican claramente una selectividad mejor del inmunoblot; esto es en parte un resultado del uso limitado de antisueros policlones en las reacciones inmunológicas.

15. K. Ogata in “*Handbook of Immunoblotting of Proteins*”, O.J. Bjerrum y N.H.H. Heegaard, Eds. CRC Press, Boca Raton, FL, 1988. Vol. 1, pp. 167-176.

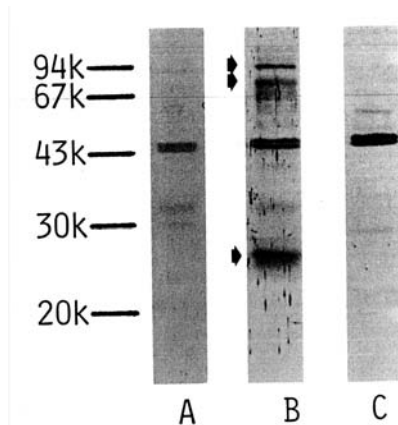


Figure 10.13. Comparación de distintos métodos para la detección de inmunoblotting. Inmunoperoxidasa (línea A), peroxidasa anti-peroxidasa (línea B) y biotina-estreptavidina (línea C).¹⁵ Reproducida, con permiso, de K. E. Johansson en “*Handbook of Immunoblotting of Proteins*”, O. J. Bjerrum and N. H. H. Heegaard, Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1988. © 1988 by CRC Press, Inc

Un ejemplo final de los métodos de inmunoelectroforesis es el método cuantitativo llamado electroforesis de cohete (rocket electrophoresis), que emplea las interacciones secundarias anticuerpo-antígeno para realizar la detección.¹⁶ El método emplea geles finos, típicamente con 1-2% de agarosa, que contienen aproximadamente 1% de anticuerpo; el antígeno es una proteína (es decir, univalente y multideterminada) y el anticuerpo es un antisuero policlonal. Se cortan pozos en el gel, previamente a la realización de la corrida electroforética, generalmente en el extremo anódico, de manera semejante al utilizado en el método de inmunodifusión radial simple (ver Capítulo 5). Los estándares y las soluciones incógnitas se colocan entonces en los pozos. Las muestras son sometidas a electroforesis a baja intensidad de campo eléctrico (< 20 V/cm) por aproximadamente 24 horas utilizando una solución tampón ácida, de tal manera que las proteínas estén cargadas positivamente y migren hacia el cátodo. La migración causa una dilución de las muestras, y cuando una equivalencia 1:1 entre Ag:Ab se alcanza, se produce la formación de una línea de precipitina. Las líneas formadas tienen forma de cohete, siendo la altura del cohete desde el lado catódico del pozo hasta la punta del cohete, directamente proporcional a la concentración de antígeno. Se ha observado que los mejores resultados con este método ocurren con corridas electroforéticas largas (> 24 h) y a baja intensidad de campo (5 V/cm); bajo estas condiciones, la electroforesis de cohete se puede utilizar para determinar cantidades en el orden de los nanogramos de proteínas. Un colorante para proteínas tal como Coomassie blue o plata puede ser utilizado para facilitar la detección visual de las líneas de precipitina, siempre y cuando se lave previamente el gel para remover los anticuerpos libres del gel. La Figura 10.14 ilustra los principios de

16. C.B. Laurell, *Anal. Biochem.* **15**, 1966, 45-52.

la electroforesis de cohete, mientras que la Figura 10.15 muestra la cuantificación de las proteínas presentes en extractos celulares de una especie de algas verdes.

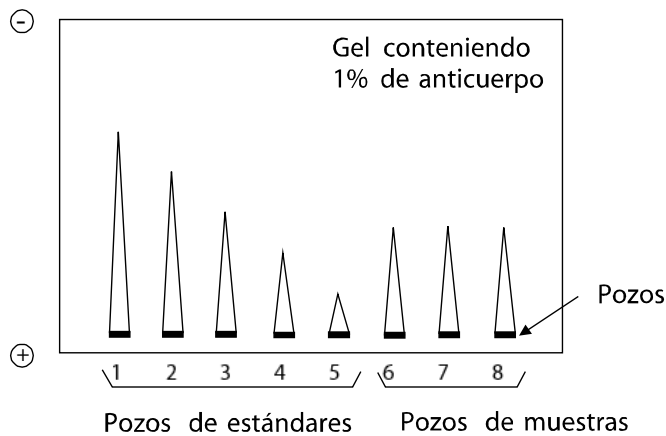


Figura 10.14. Principios de la electroforesis de cohete. La altura del cohete es medida desde el borde catódico del pozo hasta la cima del cohete, y es directamente proporcional a la concentración del antígeno.

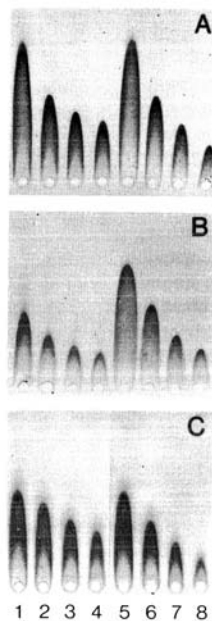


Figure 10.15. Dilución serial de proteínas purificadas y extracto crudo proveniente de células de *Chlamydomonas*.¹⁷ A: Anticuerpos ($51 \mu\text{g IgG/cm}^2$) fueron producidos contra la subunidad mayor de la proteína RuBPCase; los pozos fueron cargados con extracto celular proveniente de $31,2, 15,6, 10,4, \text{ o } 7,8 \times 10^4$ células (pozos 1-4) o con 600, 300, 150 o 75 ng de RuBPCase subunidades

17. F.G. Plumley y G.W. Schmidt, *Anal. Biochem.* **134**, 1983, 86-95.

mayores (pozos 5-8); la corrida se realizo a 14 V/cm por 24 hs. B: Anticuerpos (74 µg/cm²) fueron preparados contra la subunidad pequeña de la RuBPCase; pozos 1-4 igual que en A, pozos 5-8 contienen 300, 150, 75 o 40 ng de la subunidad pequeña de RuBPCase usados como controles; la corrida se realizo a 8 V/cm por 24 hrs. C: Anticuerpos (20 µg/cm²) fueron preparados contra polipéptidos de la membrana tilacoide; pozos 1-4 contienen extractos de 7,8, 6,2, 4,2 o 3,1 × 10⁴ celulas, y pozos 5-8 contienen membranas tilacoides purificadas correspondientes a 20, 10, 5 o 2,5 µg de clorofila; condiciones de corrida las mismas que en B. Reproducida, con permiso, de F. G. Plumley y G. W. Schmidt, *Analytical Biochemistry* **134**, 1983, 86-95.

Copyright © 1983 by Academic Press, Inc.

10.10 Lecturas sugeridas

B.S. Dunbar, “*Two-Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques*”, Plenum Press, New York, 1987.

L.A. Lewis, “*CRC Handbook of Electrophoresis*”, CRC Press, Boca Raton, 1980.

C.J. Howe y E.S. Ward, “*Nucleic Acids Sequencing: A Practical Approach*”, Oxford University Press, New York, 1989.

J. Breborowicz y A. Mackiewicz, Eds., “*Affinity Electrophoresis: Principles and Applications*”, CRC Press, Boca Raton, 1991.

G.H. Keller y M.M. Manak, *DNA Probes*, Macmillan (Stockton Press), New York, 1989.

10.11 Problemas

1. Las proteínas estándares así como las desconocidas enumeradas abajo fueron sometidas a electroforesis utilizando SDS-PAGE. Estime el peso molecular de la proteína incógnita.

Proteína	MW (kD)	Distancia de migración (cm)
Aldolasa	158	3,56
Catalasa	210	3,23
Ferritina	440	2,86
Tiroglobulina	669	2,51
Incógnita	?	3,03

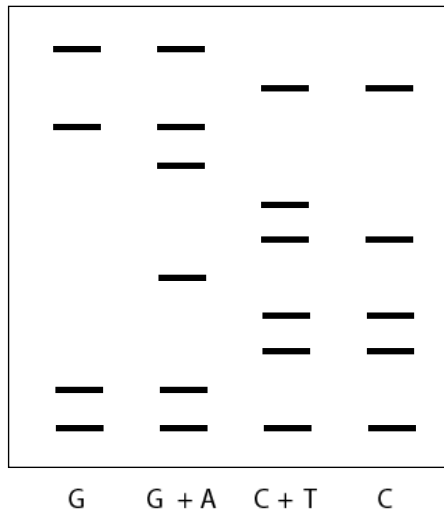
2. Una proteína que se sabe tiene alto grado de pureza es sometida a una SDS-PAGE. Se observan dos bandas, y éstas corresponden a los pesos moleculares de 50 y 75 kD. Después de proceder a la tinción y densitometría, se nota que la banda de 75 kD posee un área igual al doble que la banda de 50 kD. ¿Qué conclusiones se pueden alcanzar con respecto a la proteína original?

3. Los estándares de DNA doble cadena y una muestra incógnita fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 0,6%, luego se tiñeron con bromuro de ethidium y se fotografiaron bajo luz UV. El negativo del patrón de la separación fotografiado fue entonces explorado con un densitómetro. Los datos siguientes fueron obtenidos. Estime la longitud del DNA incógnita, en pares de bases.

Longitud (BP)	Distancia de migración (cm)
9162	5,56
8144	7,84
7126	10,12
6108	13,50
5090	17,93
4072	23,79
3054	32,06
?	15,27

4. Un oligodeoxinucleotido de diez bases en longitud fue sometido al procedimiento de Maxam-Gilbert para la determinación de su secuencia. El oligo fue etiquetado inicialmente con ^{32}P (como fosfato) en el extremo 5'. Las cuatro reacciones individuales fueron realizadas, y las mezclas fueron sembradas individualmente en cuatro calles de un gel de poliacrilamida 20 %T. Después de la electroforesis, el siguiente patrón autoradiográfico (Figura 10.16) fue obtenido:

X. APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS DE ZONA



- (a) Identifique los extremos anódicos y catódicos del gel, márquelos como la parte superior o la de abajo del diagrama. ¿En qué extremo las muestras fueron aplicadas?
- (b) Determine la secuencia de bases del oligodeoxinucleotido, comenzando por el extremo 5'.

CAPÍTULO 11

ISOELECTROENFOQUE

11.1 Introducción

Experimentos tempranos en el desarrollo de las técnicas de isoelectroenfoque, (también llamadas de enfoque isoelectrónico) empezaron en el año 1912, dando lugar a una técnica donde se alcanza el estado de equilibrio y de alta resolución. Estos experimentos se realizaron en una celda electrolítica, con el objeto de aislar el ácido glutámico de una mezcla de sus sales.¹ Una celda muy simple, en forma de “U”, tal como la utilizada para electroforesis de límite móvil (Capítulo 9), con dos membranas permeables a los iones equidistantes del centro, dando lugar a un compartimiento central que separó los compartimientos anódico y catódico, según lo puede observarse en la Figura 11.1. Las reacciones redox que ocurrían en el compartimiento anódico (Eq. 11.1) y catódico (Eq. 11.2) del electrolito generaron los iones H^+ y OH^- en los compartimientos respectivos:

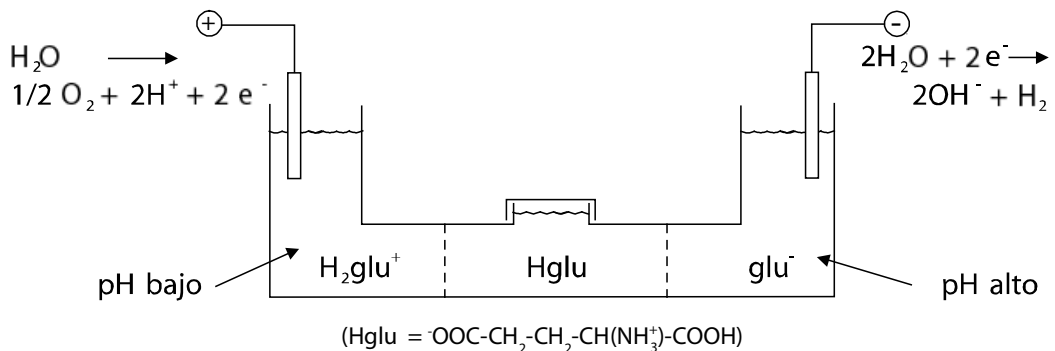


Figura 11.1. El primer experimento de isoelectroenfoque, usado para separar el ácido glutámico de una mezcla de sus sales.

1. K. Ikeda y S. Suzuki, *U.S. Patent*, 1912, Number 1,015,891.



En esta celda, el ácido glutámico colocado en el compartimiento central puede migrar libremente a través de las membranas permeables a los iones. Cuando el ácido entra en el compartimiento anódico, el pH bajo causa la protonación de los dos carboxilatos de la amina, de tal manera de que una carga neta de +1 aparece sobre la molécula. Esta especie positivamente cargada entonces migra hacia el cátodo, cruzando nuevamente la membrana del compartimiento central. Cuando el ácido glutámico cruza la membrana en el compartimiento catódico, los carboxilatos y el grupo amino son desprotonados, y la molécula logra una carga negativa neta. Esta especie migra hacia el ánodo, volviendo a cruzar la membrana del compartimiento central. El resultado de estas migraciones es que el ácido glutámico se concentra dentro del compartimiento central, a un pH cercano al de su pH isoelectrónico (pI), donde existe en la forma de ión doble (zwitterion) con una carga neta (y por lo tanto movilidad) igual a cero. La alta concentración del ácido glutámico en su valor de pI fue la primera demostración registrada del efecto denominado isoelectroenfoque (IEF).

Un avance significativo sobre este experimento simple de IEF ocurrió en 1929,² cuando el número de los compartimientos que separaban los electrolitos anódicos y catódicos fue aumentado a doce. Este trabajo demostró claramente el concepto de establecer una variación en forma discontinua en el pH entre los electrodos, usando compartimientos. Este gradiente discontinuo da lugar a una distribución de estado estacionario del pH y a una acumulación de *anfolitos* en sus valores de pH isoelectrónicos.

Los anfolitos son especies químicas capaces de albergar una carga neta positiva, cero o negativa, dependiendo del pH del medio. Los aminoácidos son ejemplos comunes de anfolitos. A su pI, la carga neta en un anfolito es cero, así que no migrará en un campo eléctrico. La especie del anfolito, por lo tanto, migrará en el campo hasta que alcanzar un compartimiento en el cual pH = pI; entonces se enfocará (concentrará) en ese compartimiento.

El método de IEF fue primeramente aplicado con éxito a las proteínas en 1938, cuando fue utilizado para separar las hormonas proteicas vasopresina y oxitocina provenientes de extracto de tejido.³ Veinte años más tarde, los anfolitos fueron en primer lugar enfocados de tal manera de obtener un gradiente *continuo* de pH, estabilizado en un medio denso de sacarosa, como alternativa al método de múltiples compartimientos. El gradiente continuo de pH en el medio conteniendo sacarosa fue establecido permitiendo que el ácido y la base difundan desde los extremos opuestos del medio de sacarosa, proceso llevado a cabo en una celda con forma de “U”, desde los respectivos compartimientos del electrodo. La estabilización de este gradiente continuo del pH con las especies denominadas *anfolitos carriers* condujo a los métodos modernos de IEF.

2. R.R. Williams y R.E. Waterman, *Proc. Exp. Biol. Med.* **27**, 1929, 56.

3. V. Du Vigneaud, G.W. Irving, H.M. Dyer y R.R. Sealock, *J. Biol. Chem.* **123**, 1938, 45-55.

11.2 Anfolitos Carrier

El concepto de los anfolitos carrier en IEF fue introducido en 1961.⁴ Estas son especies *anfotericas*, de modo que alcancen una posición de equilibrio a lo largo del medio de separación, y son buenos *electrólitos*, poseyendo tanto buena conductividad iónica, para trasportar corriente, así como capacidad tampón, y regular el pH. Se utilizan para generar gradientes estables del pH en presencia de un campo eléctrico, y son pre-enfocados en sus valores de pI antes de que la muestra se introduzca en el sistema de electroforesis. Idealmente, una mezcla de anfolito carrier consiste de especies que tienen coeficientes de difusión y movilidades eléctricas idénticos, y se diferencian en sus valores de pI por solamente 0,05 unidades de pH, para generar un gradiente lineal de pH. En la práctica, las mezclas de anfolito carrier generan cambios más bien en forma discontinua (en forma de escalones) en el pH respecto a la distancia a lo largo del medio de la separación.

La Figura 11.2 muestra los gradientes de pH calculados para mezclas de 8 especies de anfolito carrier que poseen diferencias de pI de 0,05 y 0,10 unidades de pH. Las especies individuales se enfocan en sus valores de pI, donde su capacidad tapón es baja. Un gradiente lineal del pH se genera solamente para diferencias muy pequeñas de pI; puede observarse que si una diferencia de 0,10 unidades de pH en los valores de pI de los anfolitos carrier se utiliza, se encuentra una dependencia más bien escalonada del pH respecto a la distancia.

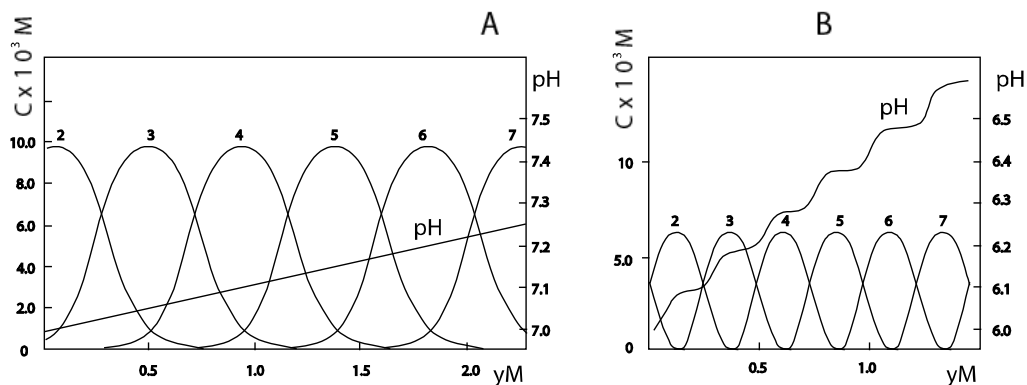


Figura 11.2. Concentración y pH en función de la distancia calculada para mezclas de 8 anfolitos carrier con diferencias de pI de (a) 0,05 y (b) 0,10.⁵ Reimpreso, con permiso, de M. Almgren, *Chemica Scripta* **1** (N° 2), 1971, 69-75. Copyright © by The Royal Swedish Academy of Sciences.

4. H. Svensson, *Acta Chem. Scand.* **15**, 1961, 325-341.
5. M. Almgren, *Chem. Scripta* **1**, 1971, 69-75.

XI. ISOELECTROENFOQUE

Los primeros estudios sobre los anfolitos carrier fueron realizados usando aminoácidos y dipéptidos, pero estas especies no dieron buenos resultados porque los valores de pKs de los grupos amino y carboxilato están demasiado alejados de sus valores de pIs. Después de que estas especies son enfocadas, poseen muy baja capacidad tampón. Una buena capacidad tampón se obtiene cuando se utilizan anfolitos cuyos valores de pKs se diferencian de sus valores de pIs por 1,5 unidades de pH o menos.

En 1969, una mezcla patentada de anfolitos carrier sintéticos fue introducida con el nombre de "Ampholine™". Estos anfolitos son ácidos amino carboxílicos polipróticos que no poseen enlaces peptídicos; cada molécula en la mezcla contiene por lo menos a cuatro grupos que pueden liberar protones, con por lo menos uno siendo una amina y por lo menos uno un ácido carboxílico. Debido a que todos los ácidos carboxílicos monovalentes poseen valores de pK en el rango de pH 4-5, y todas las aminas alifáticas monovalentes son protonadas debajo del pH 9-10, fue razonado que especies químicas que conteniendo múltiples sitios capaces de desprotonarse proporcionaría un amplio rango de valores de pK. De hecho, era sabido que oligo y poliaminas de estructura lineal o ramificada, que tengan grupos aminos separados por puentes de etileno, tienen valores de pK espaciados por determinados intervalos; por ejemplo, la tetraetilenpentamina tiene valores de pK de 9,9, 9,1, 7,9, 4,3 y 2,7 a 25 °C. Si tales poliaminas son conjugadas a un grupo ácido, por ejemplo, ácido acrílico, los criterios indispensables para un anfolito carrier son resueltos. La estructura⁶ de un componente representativo de la mezcla denominada Ampholine se puede observar en la Figura 11.3.

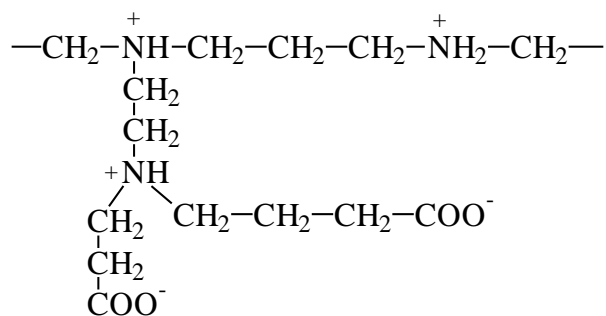


Figura 11.3. Componentes típicos del Anpholine.⁶ Los valores de pI son modificados variando el número y el tipo de los grupos R₄N⁺ y RCOO⁻.

6. P.G. Righetti, "Isoelectric Focussing: Theory, Methodology and Applications", Elsevier, New York, 1983. pp. 34-40.

11.3 Técnicas modernas de IEF con Anfolitos Carrier

La electrofóresis IEF se realiza comúnmente en geles de poliacrilamida. La preparación y la polimerización del gel se realizan en presencia de la mezcla de anfolitos, en una columna o en un gel plano vertical. El reservorio (anódico) superior entonces se llena de una solución ácida conteniendo, por ejemplo, ácido fosfórico, y el reservorio (catódico) inferior se llena de una solución básica, por ejemplo, etanolamina en solución acuosa. Se permite que estas soluciones difundan hacia el centro del gel, de tal manera de generar un gradiente del pH desde las soluciones ácida y básica de los reservorios. Este paso es seguido por un paso de preenfocado, antes de la introducción de la muestra, para permitir la migración de los anfolitos carrier a sus valores respectivos de pI. Los anfolitos carrier se enfocan así en sus pIs y estabilizan el gradiente inicial de pH. La muestra entonces se dispone como una fina capa, en las calles del extremo anódico en una solución de sacarosa, y se comienza el paso de electroenfoco; este paso puede llevar varias horas hasta que se alcance el estado estacionario, con los componentes migrando según sus movilidades hasta que se enfoquen en sus valores de pI. Debido a que el IEF es una técnica de estado estacionario, los componentes no están sometidos al ensanchamiento difusional de las bandas, observado en la electroforesis de zona, por lo que pueden alcanzarse muy altos valores de resolución. Componentes con valores de pI que se diferencian por tan poco como 0,02 unidades de pH se puede separar usando el sistema de anfolito carrier, haciéndolo útil para la separación y la cuantificación de isoenzimas.

El isoelectroenfoco se ha utilizado extensivamente para la identificación de las variantes de la hemoglobina.⁷ Más de trescientas variantes de la hemoglobina humana han sido identificadas. La variante denominada “normal” en adultos es llamada HbA, y contiene cuatro subunidades polipeptídicas incolores, denominadas globinas, llamadas α , β , γ , y δ , unidas a un grupo hemo, conteniendo un átomo de hierro. La mayoría de las variantes conocidas de la hemoglobina resultan de sustituciones de aminoácidos en las cadenas de globina α y β . Algunas variantes que todavía se consideran HbA están relacionadas con desórdenes que causan la pérdida de grupos hemo, mientras que las variantes llamadas HbM causan en los pacientes cianosis (donde Fe^{2+} se oxida demasiado fácilmente a Fe^{3+}) o bien resulta en una afinidad anormalmente alta del hierro por el O_2 (causando hemólisis crónica). La anemia falciforme es causada por un tipo de hemoglobina denominado HbS, en el cual valina es substituida por glutamato en la posición 6 del polipéptido β -globina, y ésta es la anomalía humana más común de la hemoglobina.

La hemoglobina y sus variantes tienen valores de pH isoelectrónicos que varían en un rango de cerca de una unidad de pH, entre 6,6-7,5, para la que el IEF se ha convertido en una

7. P. Basset, Y. Beuzard, M.C. Garel y J. Rosa, *Blood* **51**, 1978, 971-982.

herramienta de diagnóstico estándar. La Figura 11.4 muestra un mapa (obtenido mediante el uso de IEF) de 79 variantes humanas de la hemoglobina que exhiben casi 50 distintos valores de pI.

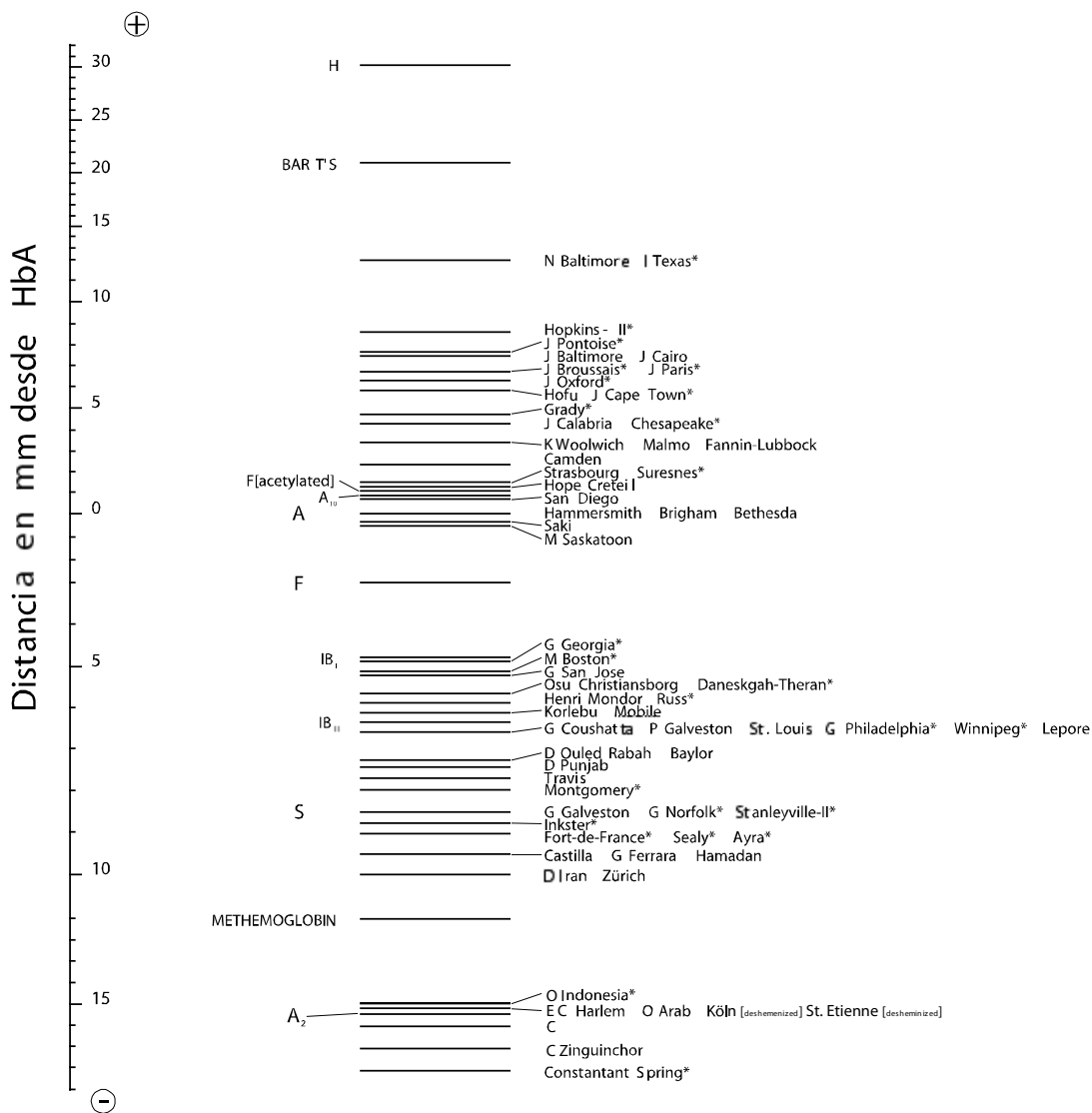


Figura 11.4. Mapa de IEF de las variantes humanas de la hemoglobina. IB_I y IB_{II} indican las formas ferrosas y férricas de HbA normal, y los asteriscos (*) indican variantes resultado de mutaciones en la cadena α .⁷ Reproducido, con permiso, de P. Basset, Y. Beuzard, M.C. Garel y J. Rosa, *Blood* 51 N° 5 (May), 1978, 971-982. © 1978 by American Society of Hematology.

Una comparación entre IEF y electroforesis de zona para la resolución de las variantes de Hb ha sido realizada usando una mezcla de HbA y cuatro variantes conocidas.⁸ Los geles luego de la tinción se observan en la Figura 11.5. Puede notarse que la técnica IEF permite que las cinco bandas sean distinguibles, mientras que el método estándar de electroforesis de zona rinde solamente dos amplias bandas, y no sería útil para los propósitos de diagnóstico.

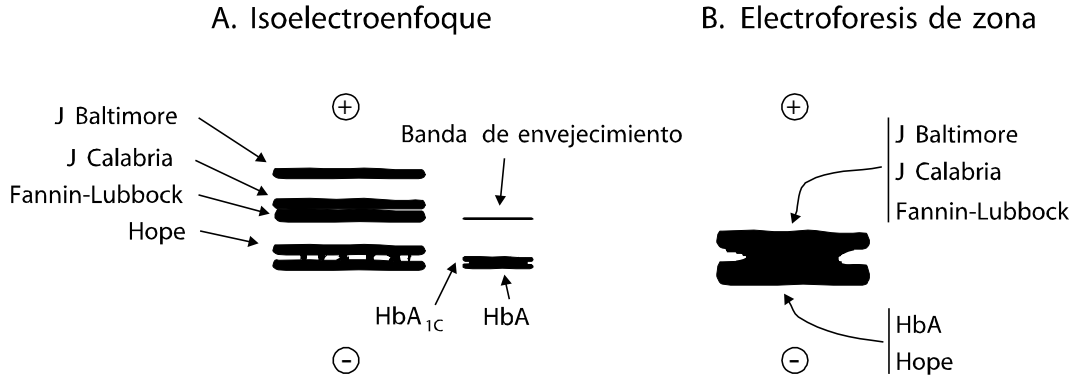


Figura 11.5. Patrones de migración de una mezcla de cinco especies de Hb (A) realizado mediante IEF sobre el rango de pH 6-9, y (B) por electroforesis en tiras de acetato de celulosa en pH alcalino.⁸ Reproducido, con permiso, de P. Basset, F. Braconnier y J. Rosa, *J. Chromatogr.* **227**, 1982, 267-304. "An Update on Electrophoretic and Chromatographic Methods in the Diagnosis of Hemoglobinopathies". © 1982 Elsevier Publishing Company.

Por ello, es que IEF es una técnica de estado estacionario que es muy útil para la separación de anfólitos que poseen curvas de titulación muy abruptas cerca de sus valores de pI, tales como las proteínas. Mientras que el analito se mueve con el gradiente de pH, su carga superficial cambia, y disminuye según la curva de titulación ácido-básica de la molécula. En el pI la movilidad es cero, y la especie se enfoca. IEF es útil para las proteínas debido a sus curvas agudas de titulación, pero los péptidos cortos no pueden ser enfocados a menos que posean por lo menos un grupo ácido o básico extra además de los grupos amino y carboxilato terminales, puesto que sin estos grupos los péptidos tendrán una carga neta igual a cero en todo el rango de pH 4-8. Las especies de mayor peso molecular que han sido examinadas utilizando IEF en geles de poliácridamida son de cerca de 750 kD; moléculas mayores que esta no pueden ser utilizadas como analito, ya que el tamaño del poro del gel limita seriamente su movilidad. El enfocado de especies de alto peso molecular requiere tiempos de corrida largos, debido a sus bajas movilidades. Debido a que el IEF es una técnica de estado estacionario, los patrones que resultan, en principio, no son dependientes del tiempo, y no son tan sensibles a la habilidad técnica del operador como son los métodos de electroforesis de zona.

8. P. Basset, F. Braconnier y J. Rosa, *J. Chromatogr.* **227**, 1982, 267-304.

Los métodos de IEF basados en la utilización de anfolitos carrier se utilizan comúnmente en las situaciones donde no se requiere muy elevada resolución de las proteínas según sus valores de pI. Varios problemas existen con el uso de los anfolitos carrier que limitan su poder de resolución. Estos incluyen la fuerza iónica baja y desigual que da lugar a un “chorreado” de las proteínas más abundantes de la muestra, la desigual capacidad tampón y conductividad, el ambiente químico desconocido, una baja capacidad de carga de muestra, y una inestabilidad a largo plazo del gradiente del pH debido a la deriva catódica de los anfolitos carrier. Incluso con estas desventajas, el IEF basado en anfolitos es capaz de resolver proteínas que se diferencian en sus valores de pI por solamente 0,02 unidades de pH. El poder de resolución más alto obtenible con métodos IEF se alcanza cuando son utilizados los gradientes de pH inmovilizados.

11.4 Gradientes de pH inmovilizados (IPGs)⁹

Los gradientes de pH se pueden inmovilizar directamente dentro del gel de poliacrilamida, realizando un gel con un gradiente desde un tipo de monómero a otro, donde las especies del monómero empleadas tienen grupos funcionales capaces de liberar o tomar protones (o dicho de otro modo, los monómeros poseen grupos protolíticos). Entonces, la capacidad tampón se mantiene rígidamente en su lugar, y el gradiente de pH se genera durante el proceso de fraguado del gel. La Figura 11.6 muestra un aparato que se utiliza para realizar el fraguado de estos geles con gradiente.

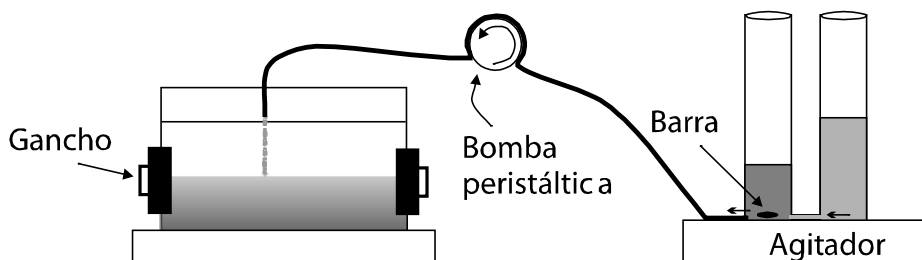


Figura 11.6. Arreglo experimental para fraguar un gel con gradiente del pH inmovilizado. Un gradiente lineal del pH es generado mezclando dos soluciones de volúmenes inicialmente iguales, donde una de las soluciones tiene alta densidad y la otra baja densidad, y son tituladas a los valores de pH extremos del intervalo deseado. La barra magnética se utiliza para agitar el depósito después de la adición de catalizadores y para equilibrar hidrostáticamente las dos soluciones.

9. B. Bjellqvist, K. Ek, P.G. Righetti, E. Gianazza, A. Görg, R. Westermeier y W. Postel, *J. Biochem. Biophys. Methods* **6**, 1982, 317-339.

La difusión de ácido y de base desde los extremos opuestos del gel convierte a los grupos protolíticos a sus formas correctas (sales son utilizadas durante el fraguado). El paso de preenfocado (necesario cuando se realiza IEF con anfolitos carrier) no es requerido con IPGs. Debido a que el paso de fraguado puede ser controlado, pueden obtenerse fácilmente gradientes lineales de pH sobre rangos muy estrechos de pH, permitiendo la resolución de proteínas que se diferencian en sus valores de pI por solamente 0,001 unidades de pH.

Algunos ejemplos de las especies monoméricas utilizadas para generar el IPG se pueden observar en la Tabla 11.1. Estos compuestos son todos derivados de la acrilamida, tienen valores de pK bien distribuidos sobre el rango de pH 3-10, y se mezclan con las soluciones del monómero de la acrilamida antes de proceder al fraguado del gel. Observe que *estas especies no son anfotéricas*. El grupo R unido al nitrógeno de la amida contiene un grupo carboxilato o un grupo amina, mientras que pH extremos se pueden generar por la incorporación de un grupo sulfónico o de una amina cuaternaria en el grupo R. La distancia entre el enlace de la amida y el grupo ionizable o el grupo con efecto tampón es bastante grande, de tal manera que la incorporación del monómero en la matriz del gel no afecta perceptiblemente el pK o el grupo tampón. Una vez que el proceso de fraguado ha concluido, estos geles pueden ser preparados en cantidad, ser secados y almacenados, de modo que con un simple paso de rehidratación antes del uso pueden obtenerse geles con gradientes reproducibles.

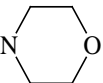
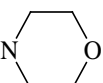
pK	Nombre	R	MW
1,2	Acido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico	$-\text{C}(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H})$	207
3,1	Acido 2-Acrilamidoglicólico	$-\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$	145
3,6	<i>N</i> -Acriloilglicina	$-\text{CH}_2\text{COOH}$	129
4,4	Acido 3-Acrilamidopropanoico	$-(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	143
4,6	Acido 4-Acrilamidobutirico	$-(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	157
6,2	2-Morfolinoetilacrilamida	$-(\text{CH}_2)_2-\text{N}$ 	184
7,0	3-Morfolinopropilacrilamida	$-(\text{CH}_2)_3-\text{N}$ 	199
8,5	<i>N,N</i> -Dimetilaminoetilacrilamida	$-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	142
9,3	<i>N,N</i> -Dimetilaminopropilacrilamida	$-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$	156
10,3	<i>N,N</i> -Dietilaminopropilacrilamida	$-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	184
>12	QAE-Acrilamida	$-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$	198

Tabla 11.1. Monómeros utilizados para la preparación de geles IPG.⁹



Con los monómeros enumerados en la Tabla 11.1, es posible crear gradientes en un rango muy pequeño de pH, usando una especie con capacidad tampón y una que puede ser titulada. Por ejemplo, 3-morfolinopropilacrilamida ($\text{pK}=7,0$) usado como tampón, y ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico como especie titulada pueden ser utilizados como material del gel, de modo que el gradiente de pH final cubra la gama de pH 6,5-7,5. El rango final de pH será lineal entre el $\text{pK} -0,5$ y el $\text{pK} +0,5$ para la especie con efecto tampón. IPGs con tales estrechos rangos de pH se utilizan para obtener una resolución muy alta de pI.

El enfoque isoelectrico en los geles IPG, con un rango de pH tan estrechos, han sido utilizados para la diagnosis de enfermedades relacionadas con la hemoglobina, tales como la β -talasemia, que es una enfermedad genética recesiva. La Figura 11.7 muestra una comparación entre geles IPG y geles con anfólitos carrier usados para separar las hemoglobinas presentes en sangre fetal del cordón umbilical de fetos normales y talasémicos de 18 semanas.¹⁰

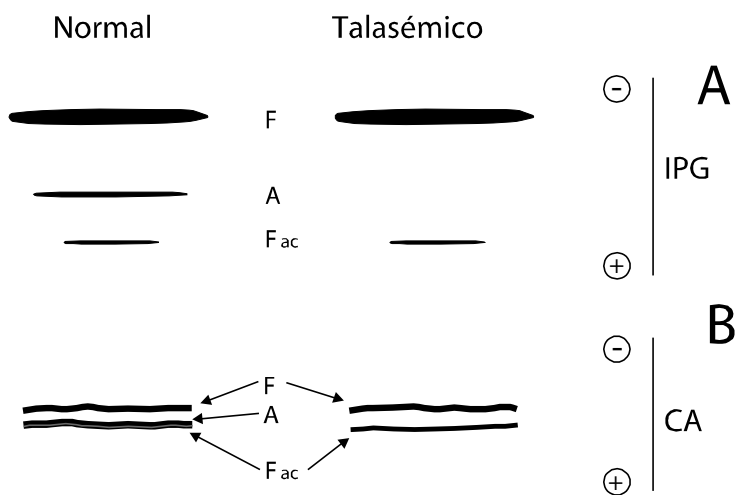


Figura 11.7. Separaciones de HbF, HbA y HbF_{ac} de sangre fetal del cordón umbilical obtenida en la semana 18 del embarazo: (A) Gel IPG cubriendo el rango de pH 6,8-7,6; (B) gel utilizando anfólito carrier cubriendo el rango de pH 6-8 (Ampholine); ambos geles fueron teñidos con Coomassie azul brillante R-250 en solución de Cu^{2+} .¹⁰ Reproducido, con permiso, de M. Manca, G. Cossu, G. Angioni, B. Gigliotti, A. Bianchi-Bosisio, E. Gianazza y P.G. Righetti, *American Journal of Hematology* **22** (N° 3, July), 1986, 285-293. “Antenatal Diagnosis of β -Thalassemia by Isoelectric Focusing in Immobilized pH Gradients”. © 1986 by Alan R. Liss, Inc.

10. M. Manca, G. Cossu, G. Angioni, B. Gigliotti, A. Bianchi-Bosisio, E. Gianazza y P.G. Righetti, *Am. J. Hematol.* **22**, 1986, 285-293.

Un feto normal poseerá tres tipos de hemoglobina a las 18 semanas: hemoglobina fetal (HbF), hemoglobina fetal acetilada (HbF_{ac}), y hemoglobina de adulto (HbA). Si el feto es homocigota para la β -talasemia, no habrá HbA presente a las 18 semanas. Los electroferogramas demuestran que el sistema de IPG permite una resolución clara de las bandas de HbA y de HbF_{ac}, mientras que el sistema de anfolito carrier produce una sola banda que contiene HbA y HbF_{ac}. Por ello, la introducción de IPGs de alta resolución ha permitido la diagnosis temprana de la enfermedad usando muestras de sangre obtenibles rutinariamente.

Un segundo ejemplo de las mejoras en las técnicas de isoelectroenfoco generadas por la introducción de los geles IPG se muestra en la Figura 11.8, donde las muestras de proteína obtenidas de semillas de leguminosa se someten a IEF por hasta 12 horas, usando anfolitos carrier y gradientes de pH inmovilizados.¹¹ En principio, las proteínas enfocadas en sus valores de pH isoelectrónicos no estarían sujetas a cambios en su posición con el tiempo, puesto que IEF es una técnica de estado estacionario más bien que dependiente del tiempo. Sin embargo, los sistemas IEF basados en la utilización de anfolito carrier es sabido que exhiben deriva catódica, que resulta del fenómeno de electroendósmosis, con la lenta deriva de la solución tampón y de anfolitos carrier, hacia el extremo catódico del gel. La Figura 11.8 muestra que esta deriva es significativa con anfolitos carrier después de solo tres horas de comenzado el experimento electroforético, mientras que los geles con gradientes de pH inmovilizados exhiben una gran estabilidad inclusive luego de corridas de más de 12 horas.

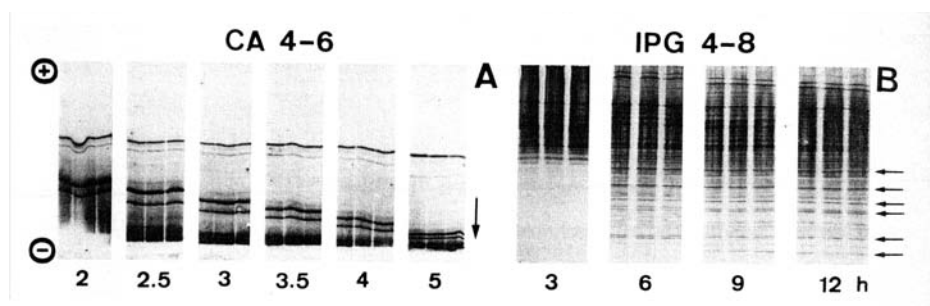


Figura 11.8. Comparación de la estabilidad de los patrones de enfoque isoelectrónico utilizando (A) anfolito carrier (rango de pH 4-6) y (B) IPG (rango de pH 4-8), para la separación de una mezcla de las proteínas de la semilla de una leguminosa.¹¹ Reproducido, con permiso, de “Methodology of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for the analysis of cell lysates and tissue proteins”, A. Görg, W. Postel, A. Domscheit y S. Günther en “*Two-Dimensional Electrophoresis*”, Proceedings of the International Two-Dimensional Electrophoresis Conference, Vienna, November 1988. A. T. Endler and S. Hanash, Eds., VCH Publishers, Weinheim, Germany, 1989. © 1988 by VCH Verlagsgesellschaft mbH

11. A. Görg, W. Postel, A. Domscheit y S. Günther en “*Two-Dimensional Electrophoresis*”, A.T. Endler y S. Hanash, Eds., VCH Publishers, Weinheim, Germany, 1989. p. 274.

Una variedad de geles prefabricados del tipo IPG está comercialmente disponible, producidos por compañías que comercializan insumos para electroforesis, y esto representa otra ventaja significativa sobre sistemas que utilizan anfolitos carrier, puesto que la reproducibilidad de gel a gel es elevada cuando estos geles están preparados inicialmente en grandes cantidades.

La estabilidad de la separación y la alta resolución promovida por el enfoque isoelectrico en geles de gradiente de pH inmovilizados también se ha explotado en los métodos electroforéticos bidimensionales, donde una IEF se realiza en la primera dimensión y es seguida por un segundo método de separación realizado en una dirección perpendicular.

11.5 Electroforesis bidimensional¹²

Las técnicas de separación bidimensionales (2D) son aquellas en las que una muestra se somete a dos procesos donde la movilidad de las moléculas ocurre ortogonalmente uno respecto al otro. Las dos dimensiones deben estar basadas en mecanismos de separación totalmente distintos, puesto que mecanismos idénticos simplemente producen patrones diagonales de separación. El poder resolutivo de las técnicas 2D se puede expresar por la Eq. 11.3:

$$n_2 = n_1^2 \quad [11.3]$$

donde n_2 es el número de componentes que pueden ser resueltos por un método 2D y n_1 el número de componentes que pueden ser resueltos por una técnica 1D.

Hasta la fecha, la combinación con mayor poder resolutivo de técnicas electroforéticas emplea IEF en la primera dimensión, resolviendo en base al pI, y SDS-PAGE en la segunda dimensión, separando en base al peso molecular. Esta secuencia es crucial, puesto a que el punto isoelectrico de una proteína desaparece efectivamente luego del tratamiento con SDS, con el que se obtiene una relación uniforme entre carga negativa y masa.

La utilización de electroforesis 2D fue informada por primera vez en 1975, cuando fue empleada para el análisis cualitativo de una mezcla muy compleja de proteínas de *E. coli*, para las cuales las técnicas de una dimensión son inadecuadas. Para la primera dimensión se utilizaron anfolitos carrier, realizando una electroforesis IEF en columna; para la realización de este primer gel se utilizó Ampholine pH 3-10, urea, un surfactante no iónico, acrilamida y entrecruzante, TEMED y persulfato. Luego de la gelificación, se sumergieron los extremos del gel en depósitos catódicos y anódicos conteniendo, respectivamente, NaOH 0,01 M y

12. P.H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.* **250**, 1975, 4007-4021.

H_3PO_4 0,02 M, se realizó un paso previo de preenfocado seguido de una corrida electroforética IEF de 13 horas. El voltaje del IEF fue seleccionado de modo que producto del voltaje total por tiempo estuviera entre cinco y diez mil voltio-hora. El gel fue entonces retirado de la columna IEF usando una jeringuilla y una tubuladura, equilibrado por 30 minutos en una solución de glicerol, mercaptoetanol, SDS y solución tampón. La segunda dimensión empleó un SDS-PAGE discontinuo en un gel plano de la misma anchura que la longitud de la columna inicial usada para IEF, según lo que puede observarse en la Figura 11.9.

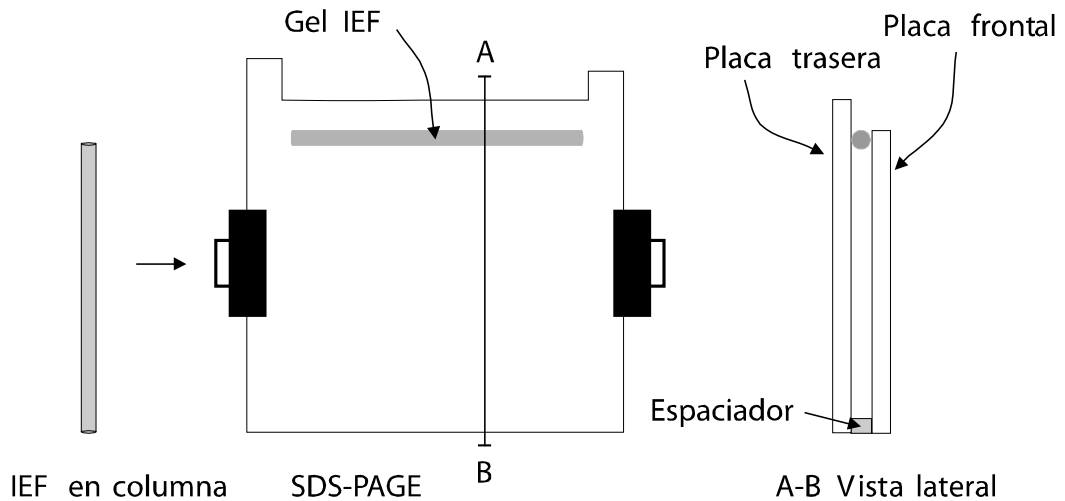


Figura 11.9. Celda electroforética utilizada para la segunda dimensión (SDS-PAGE).

Tres geles fueron utilizados para la segunda dimensión: (a) un gel de carga de agarosa al 1% que rodeó el gel IEF para reducir al mínimo la pérdida de proteínas en la solución tampón del compartimiento superior, (b) un gel concentrador de poliacrilamida al 5% con 0,1% SDS en pH 7, y (c) un gel separador, poseyendo un gradiente de poliacrilamida 9-14% con 0,1% SDS en pH 9. Para la corrida electroforética, una solución tampón de pH 9, conteniendo 2% SDS fue utilizada durante las 5 horas del proceso, luego el gel completo fue retirado, fijado y teñido con azul de Coomassie. El patrón de la separación obtenido se observa en la Figura 11.10.

La electroforesis de dos dimensiones es ahora utilizada comúnmente con gradientes inmovilizados de pH en la primera dimensión, y el término IPG-DALT se ha acuñado para esta técnica 2D. Los geles comercialmente disponibles de IPG se pueden utilizar para la primera dimensión, y las tiras de este gel que contiene las proteínas enfocadas se equilibran en una solución de SDS-mercaptoetanol y después se aplican al extremo catódico del gel plano SDS-PAGE. La Figura 11.11 muestra una comparación de electroforesis 2D realizada utilizando un gradiente de pH no lineal producido por anfólitos carrier y un IPG lineal

XI. ISOELECTROENFOQUE

para el enfocamiento isoelectrico de la primera dimension.¹³ Note especialmente la carencia de chorreado en la dimension horizontal (IEF), asi como la resolucion mejorada entre el pH 6 y 7 que ocurre en el gel que emplea como primera dimension IPG.

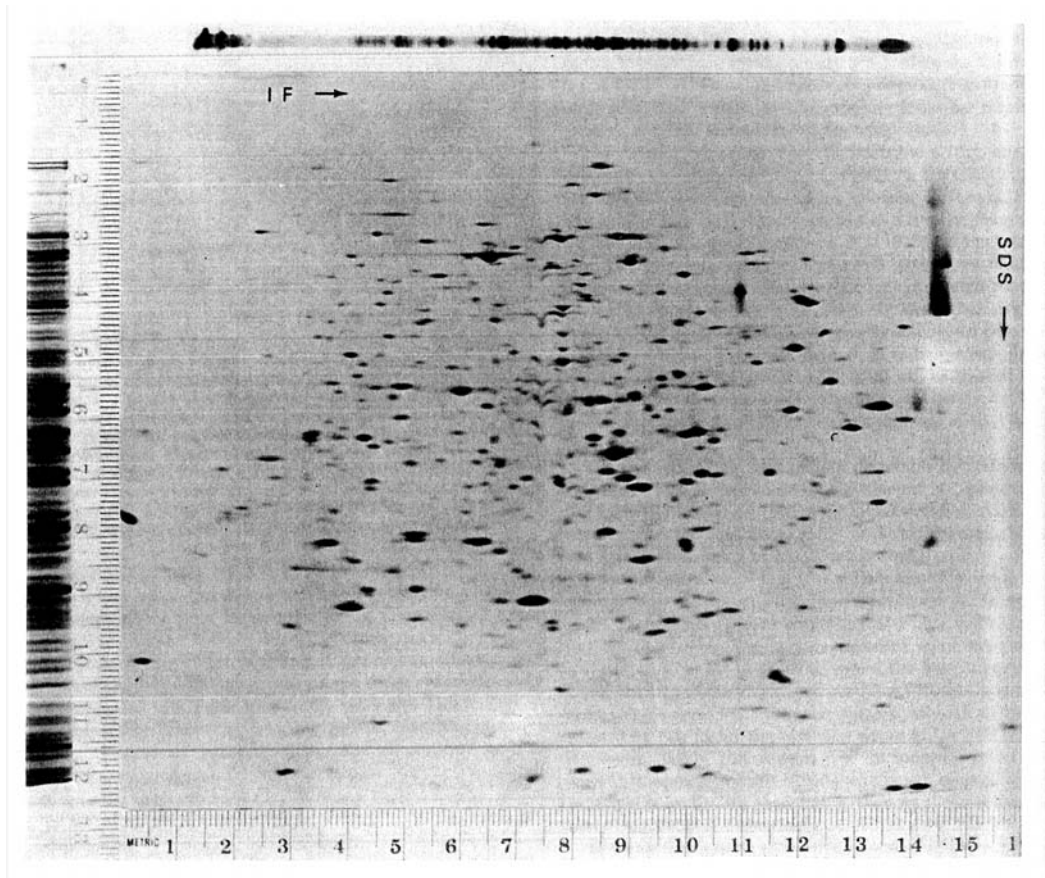


Figura 11.10. La separación bidimensional de una mezcla de proteínas de *E. coli*, usando IEF con anfólitos carrier, en el rango de pH 3-10, en la primera dirección (horizontal), y la segunda dimensión fue SDS-PAGE que fue corrida desde la parte superior hacia abajo en un gel separador con gradiente de poliácridamida 9-14% fraguado con 0,1% de SDS.¹² Reproducido, con permiso, de P. H. O'Farrell, *The Journal of Biological Chemistry* **250** (No 10 May 25), 1975, 4007-4021. "High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins". Copyright © 1975 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

13. A. Görg, W. Postel, A. Domscheit y S. Günther in "Two-Dimensional Electrophoresis", A.T. Endler y S. Hanash, Eds., VCH Publishers, Weinheim, Germany, 1989. p. 275.

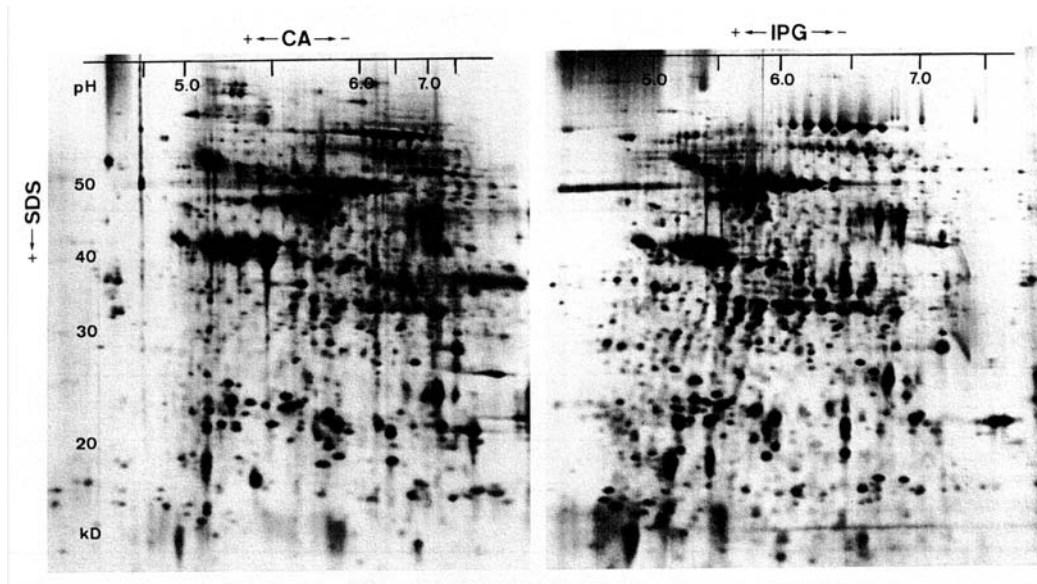


Figura 11.11. Comparación de los patrones bidimensionales obtenidos para las proteínas de la semilla de una leguminosa después de realizar la primera dimensión (IEF) con (A) anfolitos carrier y (B) un gradiente de pH inmovilizado. EL IEF procedió en la dirección horizontal, con los valores de pH según lo indicado en los geles, y la SDS-PAGE se realizó desde arriba hacia abajo, con los pesos moleculares indicados en (A).¹³ Reproducida, con permiso, de A. Görg, W. Postel, S. Günther, *Electrophoresis* **9** (1988) 531-546. "The Current State of Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients". © 1988 by VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim.

IPG-DALT puede ser utilizado para la separación de hasta 5000 componentes en una mezcla de proteínas, y recientemente ha sido incorporado como herramienta cualitativa para el análisis diagnóstico en química clínica. Sin embargo, no se utiliza generalmente para la cuantificación de proteínas en una mezcla, debido a que la pérdida de componentes de bajo peso molecular ocurre a menudo durante los pasos de equilibrio y transferencia al SDS. Una descripción excelente de las capacidades y de los protocolos técnicos de IPG-DALT está disponible en un artículo de revisión.¹⁴

14. A. Görg, C. Obermaier, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber y W. Weiss, *Electrophoresis* **21**, 2000, 1037-1053.

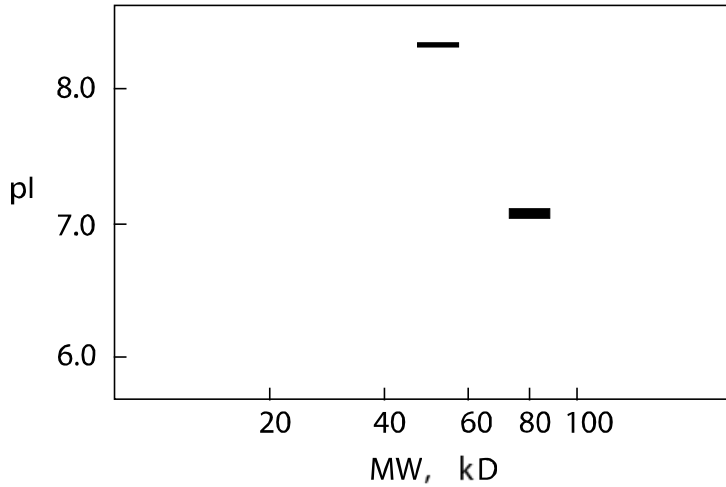
11.6 Lecturas sugeridas

- N. Catsimpoolas, “*Isoelectric Focusing*”, Academic Press, New York, 1976.
- P.G. Righetti, “*Isoelectric Focussing: Theory, Methodology and Applications*”, Elsevier, New York, 1983.
- P.G. Righetti, “*Immobilized pH Gradients: Theory and Methodology*”, Elsevier, New York, 1990.
- N. Catsimpoolas y J. Drysdale, “*Biological and Biomedical Applications of Isoelectric Focusing*”, Plenum Press, New York, 1977.
- Endler y Hanash, “*Two-Dimensional Electrophoresis*”, Wiley, New York, 1988.

11.7 Problemas

1. Explique la diferencia fundamental entre la electroforesis de zona, según lo discutido en los Capítulos 9 y 10, y la técnica de estado estacionario isoelectroenfoque. ¿Por qué algunos de los geles empleados para IEF exhiben comportamiento dependiente del tiempo?
2. Un gradiente perfectamente lineal de pH fue inmovilizado a lo largo de un gel de poliacrilamida de 10 cm usando 3-morfolinopropilacrilamida pK 7,0 titulado con el ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico. Este gel fue utilizado para enfocar una mezcla de tres variantes de Hb, con valores de pI de 7,42 (Hb A₂), 7,21 (Hb S) y 7,05 (Hb F). Calcule las posiciones de las tres bandas enfocadas como distancias desde extremo catódico del gel.
3. Sugiera un método por el cual un anticuerpo marcado enzimáticamente podría ser utilizado para identificar un componente de la mezcla de proteínas provenientes de semillas de leguminosa en la Figura 11.8. ¿Por qué no se esperaba que este tipo de método funcione después de cualquiera de las separaciones 2D que se observan en la Figura 11.11?
4. ¿Por qué cuándo se utiliza electroforesis bidimensional para separar mezclas complejas de proteínas, es necesario realizar el enfoque isoelectroenfoque en la primera dimensión?
5. ¿Por qué el isoelectroenfoque es útil para las proteínas y las glicoproteínas, pero no para los ácidos nucleicos? ¿Qué le sucedería a DNA o RNA presente en una mezcla de proteínas, luego de un larga corrida electroforetica (isoelectroenfoque) en el rango de pH 6-8?
6. Una proteína purificada, desconocida, fue examinada usando el método de Ferguson (Capítulo 10), y su pI y peso molecular fueron determinados, obteniéndose valores de

7,8 y 210 kD, respectivamente. La proteína fue expuesta a ditioneitol, para reducir los enlaces disulfuro que conectan subunidades, y un experimento de IPG-DALT fue realizado sobre el rango de pH 6-8,5. El patrón de la separación que resultó se muestra más abajo (Figura 11.12):



¿Qué nueva información es proporcionada por estos resultados respecto a la proteína desconocida?

7. ¿En qué etapa se deben agregar las proteínas marcadoras de peso molecular en un experimento de IPG-DALT? ¿Por qué?

CAPÍTULO 12

ELECTROFORESIS CAPILAR

12.1 Introducción

Tanto la electroforesis de estado estacionario así como la zonal han sido realizadas en el interior de tubos capilares conectando los reservorios anódicos y catódicos conteniendo una solución tampón. Los tubos capilares, rellenos con gel o bien solo solución tampón, actúan como contenedores de volúmenes muy pequeños de medio soporte, y también controlan la velocidad del flujo electroosmótico. El fenómeno de electroósmosis, que se trata de reducir al mínimo para la mayoría de las técnicas de alta resolución electroforéticas, es de importancia crítica en la electroforesis capilar (CE), dado que determina la velocidad a la que la solución que contiene el analito ingresa y se mueve a través del tubo capilar. La electroósmosis crea un flujo de solvente a través del tubo capilar que es bastante fuerte para eluir todos los componentes (sin importar su carga) a través de un extremo del capilar, lo que permite automatizar fácilmente esta técnica; mucha de la instrumentación desarrollada para cromatografía líquida (detectores y otros) ha sido adaptada para su uso en equipos de electroforesis capilar.

Los tubos capilares ofrecen varias ventajas cuando se comparan con las columnas y los geles planos convencionales utilizados en las separaciones electroforéticas. La disipación de calor en los capilares por unidad de volumen, a través de las paredes del capilar es más eficiente, lo que permite que campos eléctricos más altos sean empleados durante las corridas; fuerzas del campo tan altas como 50 kV/m (500 V/cm) no son infrecuentes en técnicas capilares. Esto permite separaciones rápidas con un ensanchamiento mínimo de las bandas debido a fenómenos difusionales. Además, los volúmenes relativamente pequeños utilizados permiten el muestreo de microambientes, tales como el citoplasma de una célula única.

El arreglo instrumental empleado comúnmente en electroforesis capilar puede observarse en la Figura 12.1. Con tubos capilares de sílice sin tratamiento alguno, la electroósmosis hace que la solución tampón fluya desde ánodo al cátodo. Las muestras se introducen en el extremo anódico, y un detector dispuesto directamente sobre la columna o luego de ella (post-columna) se coloca en o cerca del extremo catódico del tubo capilar. La elevada diferencia de potencial producida por la fuente implica riesgos de choque eléctrico, por lo que el reservorio de solución tampón anódico se encuentra blindado.

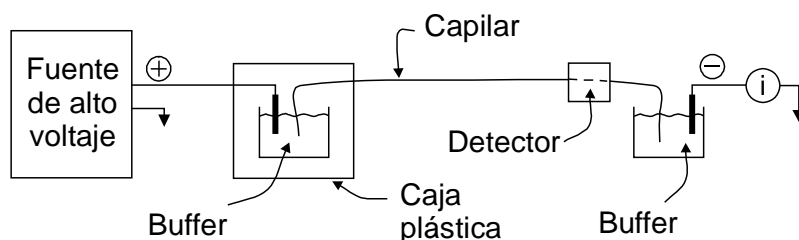


Figura 12.1. Instrumentación para electroforesis capilar (CE).¹ Reproducido, con permiso, de A.G. Ewing, R.A. Wallingford and T.M. Olefirowicz, *Anal. Chem.* **61**, 1989, 292A-301A. "Capillary Electrophoresis". © 1989 American Chemical Society.

Muchas técnicas electroforéticas se han adaptado para ser realizadas en tubos capilares. La más comúnmente utilizada es la electroforesis capilar de zona (CZE), donde una solución tampón llena y fluye por el tubo capilar, y la separación se basa en diferencias de movilidad. Los tubos capilares también se utilizan llenos de gel de poliacrilamida, y mucho esfuerzo se ha realizado para utilizar estos tubos capilares rellenos de gel para la secuenciación de DNA, para el Proyecto del Genoma Humano. Experimentos de enfoque isoelectrico también han sido realizados en tubos capilares, diversas técnicas se han desarrollado para eluir las proteínas enfocadas por un extremo del tubo capilar, para su detección. Estas tres técnicas principales de CE serán el tema de este Capítulo.

La descripción matemática de las separaciones de CZE asume que la disipación de calor es eficiente (para los sistemas refrigerados por aire, esto significa tubos capilares de paredes gruesas, mientras que los tubos capilares refrigerados por agua son de paredes delgadas), y que la única causa significativa del ensanchamiento de las bandas es la difusión longitudinal del soluto dentro del tubo capilar.

Comenzamos inicialmente ignorando la electroósmosis, y considerando solamente la migración de la especie cargada del analito en un campo eléctrico. La velocidad de la migración, v (véase el Capítulo 9), esta relacionada con la movilidad del analito, μ , y la fuerza del campo eléctrico, E , por la Eq. 12.1:

$$v = \mu E = \mu V/L \quad [12.1]$$

donde V el voltaje aplicado, y L es la longitud del tubo capilar. De esta expresión, podemos calcular el tiempo de migración del analito como:

$$t = L/v = L^2/(\mu V) \quad [12.2]$$

1. A.G. Ewing, R.A. Wallingford y T.M. Olefirowicz, *Anal. Chem.* **61**, 1989, 300A-303A.

De la Eq. 12.2 podemos ver que una rápida elución de los componentes de la muestra requiere altos voltajes y/o tubos capilares cortos

Mediante analogía con los métodos cromatográficos, podemos también calcular el número de platos teóricos poseídos por un tubo capilar dado en determinadas condiciones de voltaje y respecto a una dada especie de analito. Este número, N , también es llamado eficiencia de separación; valores más altos rinden generalmente mejores separaciones.

$$N = \mu V / (2D), \quad [12.3]$$

donde D es el coeficiente de difusión del analito. Debe observarse que el número de platos teóricos, N , depende del voltaje aplicado, pero no depende de la longitud del tubo capilar.

12.2 Electroósmosis

La electroósmosis resulta de la carga que reside en la pared interna del tubo capilar. Con los tubos capilares de sílice sin tratamiento, esta carga es negativa, y los contraiones positivos existen en una capa retenida, adyacente a las paredes capilares. La naturaleza cationica de esta capa retenida se extiende más lejos hacia la solución en el interior del capilar, cubriendo una región que es aproximadamente 3-300 nm desde la pared capilar, para concentraciones de solución tampón de 10^{-3} a 10^{-6} M, respectivamente. La Figura 12.2 muestra una representación esquemática del ambiente iónico en la interfaz entre la pared de sílice y la solución.

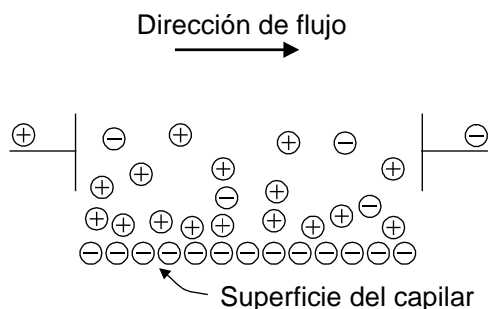


Figura 12.2. Iones en la interfase sílice-solución en la pared interna de un capilar para CE.

El potencial que existe a través de esta región se llama el potencial zeta, ξ , y se puede describir por la EQ. 12.4:

$$\xi = 4\pi n \mu_{EO} / \epsilon \quad [12.4]$$

donde n es la viscosidad de la solución, μ_{EO} es el coeficiente para el flujo electroosmótico, y ε es la constante dieléctrica de la solución. Utilizando la Eq. 12.4, la velocidad lineal del flujo electroosmótico, U , se puede calcular fácilmente como:

$$U = [\varepsilon/(4\pi n)]E\xi \quad [12.5]$$

La Eq. 12.5 indica que el caudal electroosmótico es grande cuando ξ es grande y cuando la región interfacial es pequeña.

12.3 Elución de los componentes de la muestra

Tomando en cuenta la electroósmosis, la velocidad y el tiempo de residencia del analito se pueden recalculan como:

$$v = (\mu + \mu_{\text{EO}})V/L \quad [12.6]$$

$$t = L^2/[(\mu + \mu_{\text{EO}})V] \quad [12.7]$$

Utilizando las Eqs. 12.6 y 12.7, la eficiencia de la separación, o el número de platos teóricos, N , se convierte:

$$N = (\mu + \mu_{\text{EO}})V/2D \quad [12.8]$$

Es evidente al observar la Eq. 12.6 que μ , la movilidad del analito, puede ser positiva o negativa (es decir, el analito migrará en cualquier dirección, según su carga), mientras que el μ_{EO} , el coeficiente de flujo electroosmótico, es una constante para dadas condiciones experimentales, que darán lugar a un flujo en una única dirección. Para los tubos capilares de sílice sin tratamiento, si el μ_{EO} es bastante grande, todos los iones migrarán hacia el cátodo (aniones más lentamente que los cationes), y las especies sin carga serán llevadas por el flujo electroosmótico en el interior del capilar. El orden de elución de los analitos será por lo tanto cationes primero, los neutrales en segundo lugar y los aniones al final.

El flujo electroosmótico puede ser modificado aumentando la viscosidad en la interfase entre el tubo capilar y en la solución usando adsorbentes, modificando las paredes del capilar de sílice de tal manera de reducir su carga o bien cambiar su signo, o variando el pH de la solución tampón utilizada. La concentración del tampón debe mantenerse a niveles perceptiblemente más altos que la concentración del analito, de modo que el campo eléctrico sea constante a través del tubo capilar. Sin embargo, la concentración de la solución tampón debe también ser suficientemente baja para evitar el calentamiento excesivo dado

por i^2R ; se realizan experimentos en una variedad de fuerzas iónicas para determinar las condiciones óptimas.

Mientras que algunas técnicas requieren la ausencia del flujo electroosmótico durante la separación en sí misma (electroforesis capilar en gel y enfoque isoelectrónico capilar), la mayoría de las técnicas usuales explotan el flujo electroosmótico para la introducción y la detección de la muestra. La electroforesis en tubos capilares llenos de solución tampón utiliza el flujo electroosmótico en una manera análoga a una fase móvil cromatográfica: el flujo se utiliza para transportar el analito del cátodo al ánodo y la separación ocurre continuamente entre la introducción y la detección de la muestra.

12.4 Introducción de la muestra²

Dos métodos para la introducción de la muestra se emplean comúnmente en electroforesis capilar. La inyección *hidrodinámica* se basa en sifónear, o alimentar la muestra por gravedad dentro del extremo anódico del tubo capilar. El extremo anódico se quita del depósito de la solución tampón y se pone en la solución de la muestra. El extremo capilar entonces se levanta de tal modo que el nivel del líquido en el recipiente de la muestra esté a determinada altura Δh sobre el nivel del recipiente catódico de solución tampón, y se mantiene en esta posición por un tiempo fijo t . Este proceso se ha automatizado para mejorar su reproducibilidad, y se ha demostrado que el caudal hidrodinámico puede ser descrito por la Eq. 12.9:

$$v_{hd} = \rho g r^2 \Delta h / 8nL, \quad [12.9]$$

donde v_{hd} es velocidad de flujo, ρ es la densidad de la solución tampón, g es la aceleración gravitacional, r es el radio interno del capilar, Δh es la diferencia en altura entre los dos niveles líquidos de los depósitos, n es la viscosidad de la solución tampón y L es la longitud capilar. Esta técnica de inyección no discrimina entre los iones, de modo que las concentraciones relativas de los iones de la muestra introducidos dentro del tubo capilar estarán en la misma proporción que en la solución de la muestra.

La inyección *electrocinética* implica atraer los iones de la muestra dentro del interior del tubo capilar mediante un potencial aplicado. El extremo anódico del tubo capilar se quita del depósito de solución tampón y se coloca en el recipiente de la muestra junto con el ánodo. Un voltaje de inyección se aplica por un breve tiempo, para causar la migración y la introducción electroosmótica de la muestra. Debido a que el potencial aplicado induce un flujo electroosmótico del líquido de la muestra en el tubo capilar, la velocidad de este flujo

2. R.A. Wallingford y A.G. Ewing en "Advances in Chromatography", Vol. 29, J.C. Giddings, E. Grushka y P.R. Brown, Eds., Marcel Dekker, New York, 1989. p. 22.

de la muestra se debe sumar a la velocidad de la electromigración de cada ión. Mientras que ambos componentes de la velocidad son proporcionales al voltaje aplicado (más exacto al campo eléctrico local), las movilidades de los iones y debido a ello las velocidades netas de la inyección son diferentes entre los iones. Esto significa que la inyección electrocinética discrimina entre los iones, introduciendo proporcionalmente más iones de aquellos que son más móviles. Además, si la conductividad de la muestra es menor a la conductividad de la solución tampón utilizada en la corrida electroforetica, la alta resistencia de la muestra induce un campo eléctrico localmente alto que da lugar a la inyección de una mayor cantidad de muestra, pero con menor reproducibilidad.

Se ha demostrado que en ambas técnicas de inyección el analito sufre difusión, especialmente cuando el tubo capilar se introduce inicialmente en la solución de la muestra. La difusión ocurre a través del área límite entre el analito y la solución tampón, que es definido por el área de sección transversal del tubo capilar. Ambas técnicas sufren también de los efectos del flujo hidrodinámico, el que puede darse inadvertidamente como resultado de que los niveles de los líquidos de los reservorios de solución tampón estén a niveles levemente distintos. Mientras que estos efectos son significativos para los tubos capilares llenos de solución tampón usados en electroforesis capilar de zona, son ambos mucho menos importantes cuando el tubo capilar se llena de gel.

La Figura 12.3 muestra tres diseños de microinyectores que han sido utilizados para la inyección electrocinética de muestras muy pequeñas, de microambientes tales como células nerviosas únicas. Los diámetros capilares de la extremidad en estos inyectoros son de 10 μm de diámetro externo, y pueden penetrar y muestrear células aisladas. El diseño mostrado en la Fig. 12.3C ha demostrado ser el más eficaz, porque la electrólisis ocurre lejos de la extremidad capilar y por lo tanto no introduce burbujas, que podrían aislar los extremos capilares.

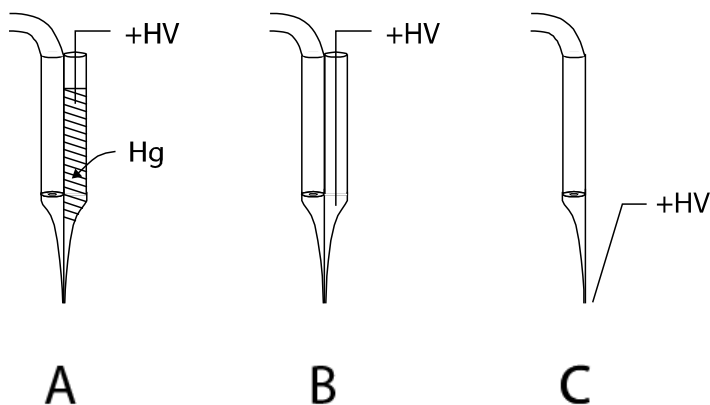


Figura 12.3. Tres microinyectores usados para la inyección electrocinética de líquidos intracelulares de células únicas.²

12.5 Detectores para electroforesis capilar

Los detectores usados en los experimentos iniciales de electroforesis capilar fueron detectores simples de absorbancia y fluorescencia, que habían sido adaptados de equipos de HPLC. Sin embargo, pronto fue evidente que estos instrumentos poseían pobres límites de detección y sensibilidad, debido a la naturaleza de las técnicas capilares. Los problemas específicos que se asociaron a la detección en la electroforesis capilar incluyen las dimensiones pequeñas de los capilares, con diámetros internos de 100 μm o menos (tan bajo como 12,7 μm), así como los volúmenes pequeños de las bandas originadas en la separación, ya que los volúmenes de inyección están en el rango de 18 pL hasta 50 μL . Esto conduce a longitudes de bandas de 10 milímetros o menos dentro del tubo capilar. Debido a que los detectores post-columna (que se encuentran luego de la salida capilar) introducen un significativo ensanchamiento de las bandas separadas, los dispositivos de detección ubicados directamente en el capilar son generalmente preferidos.

La Tabla 12.1 muestra la diversidad de métodos de detección en electroforesis capilar que se han utilizado hasta la fecha, así como sus límites de detección divulgados. Mientras que los límites de detección para los métodos instrumentales se informan generalmente en unidades de concentración, los informados para los métodos de CE se dan generalmente en moles, debido al ensanchamiento de las bandas (la concentración máxima en el detector es siempre menor que la concentración inyectada) y la variedad de volúmenes de inyección que son posibles entre instrumentos con diversos tamaños de tubos capilares y diversos potenciales tanto de inyección como de operación.

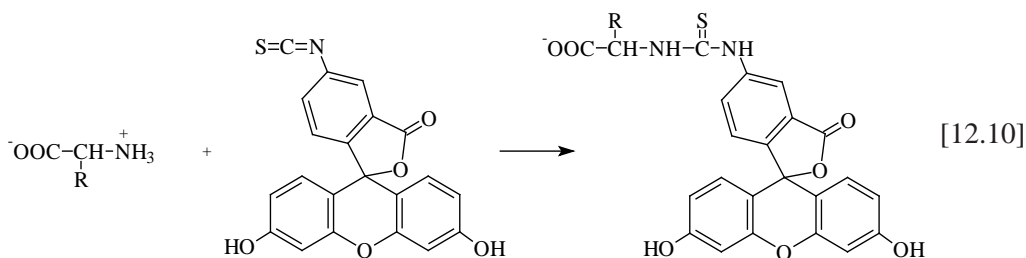
Clasificación	Propiedad Medida	Límite de Detección (mol)
Óptica	Absorbancia	$10^{-15} - 10^{-13}$
	Fluorescencia	
	-(a) Derivatización Pre-columna	$10^{-21} - 10^{-17}$
	-(b) Derivatización In-columna	8×10^{-16}
	-(c) Derivatización Post-columna	2×10^{-17}
	Fluorescencia indirecta	5×10^{-17}
	Thermal lensing	4×10^{-17}
	Raman	2×10^{-15}
Electroquímica	Conductividad	1×10^{-16}
	Corriente (amperometría)	7×10^{-19}
Radioquímica	^{32}P Emisión	1×10^{-19}
Masa	Espectrometría de masa con ESI	1×10^{-17}

Tabla 12.1. Detectores usados en instrumentos utilizados para electroforesis capilar de zona.¹ Reproductorio, con permiso, de A.G. Ewing, R.A. Wallingford and T.M. Olefirowicz, *Anal. Chem.* **61**, 1989, 292A-301A. "Capillary Electrophoresis". © 1989 American Chemical Society.

Los detectores que han producido los límites de detección más bajos hasta la fecha se basan en fluorescencia con derivatización antes del ingreso a la columna, espectrometría de masa, radiometría y amperometría. Los usos se describen abajo para estos sistemas de detección empleados con instrumentación para CE convencional. Para la utilización de estos métodos de detección al análisis de CE utilizando dispositivos microfabricados, el lector es referido a un artículo de revisión.³

12.5.1 Detección por fluorescencia inducida por laser⁴

Este método de detección se ha probado con una serie de aminoácidos derivatizados antes de la inyección con isotiocianato de fluoresceína, para obtener los productos que son excitados a 488 nm y producen emisión de fluorescencia a 528 nm (Eq. 12.10):



Los aminoácidos derivatizados se separan en solución tampón de carbonato 5 mM, pH 10, en un tubo capilar de sílice fundida de 50 μm de diámetro interno y 99 cm de longitud, con un potencial de separación de 25 kV. La inyección electrocinética se realiza en el extremo anódico del tubo capilar, con un potencial de inyección de 2 kV aplicado durante 10 segundos.

La Figura 12.4 muestra un diagrama esquemático del detector de fluorescencia inducida por láser utilizado. El tubo capilar de sílice fundida usado para la electroforesis se coloca cerca de 1 centímetro dentro del compartimiento de flujo de la cubeta con flujo envolvente. La corriente del flujo envolvente rodea la muestra al salir del tubo capilar, formando una corriente fina en el centro del compartimiento de flujo. Un rayo láser enfocado sobre la muestra (no se muestra) excita fluorescencia. La fluorescencia se colecta perpendicularmente, con un objetivo de microscopio, y pasa a través de filtros (eliminando la radiación debajo de 495 nm y sobre 560 nm), para reducir la dispersión Raman y Rayleigh de la luz, y pasa a través de un ocular equipado con una pequeña abertura de 200 μm de diámetro. Esta pequeña abertura restringe el campo visual del fotomultiplicador (PMT) utilizado como detector al flujo de la muestra que esta siendo iluminada. La alineación exacta del rayo láser, el objetivo,

3. G.J.M. Bruin, *Electrophoresis* 21, 2000, 3931-3951.

4. Y.-F. Cheng y N.J. Dovichi, *Science* 242, 1988, 562-564.

la abertura del ocular y el PMT se requieren para la detección de la emisión máxima de la muestra. El cuerpo de acero inoxidable de la cubeta y así como todas las piezas metálicas asociadas se mantienen a potencial de tierra.

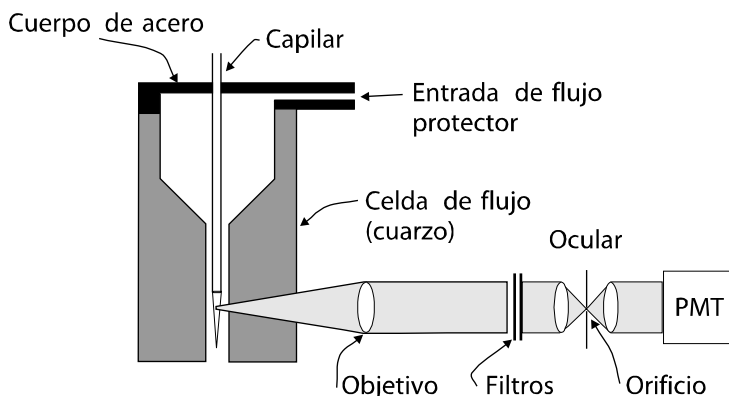


Figura 12.4. Detector de fluorescencia inducida por láser para CZE.⁴ Reproducido, con permiso, de Y.-F. Cheng y N.J. Dovichi, *Science* **242**, 1988, 562-564. "Subattomole Amino Acid Analysis by Capillary Zone Electrophoresis and Laser-Induced Fluorescence". Copyright © 1988 by AAAS.

La Figura 12.5 muestra un electroferograma obtenido utilizando este detector después de la inyección y separación de una mezcla de 15 aminoácidos derivatizados con FITC; la Tabla 12.2 a continuación resume los límites de detección observados para cada aminoácido. Mientras que la detección de aminoácidos no es en sí misma de un interés particular, los péptidos y las proteínas que están solo disponibles en cantidades muy pequeñas pueden ser analizadas por su contenido de aminoácidos, luego de ser sometidas a hidrólisis ácida, usando la instrumentación descrita aquí.

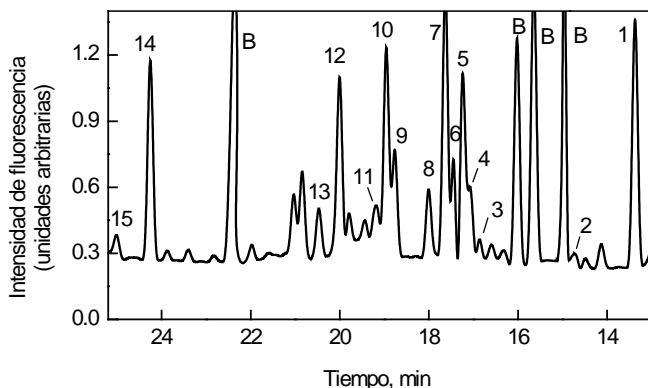


Figura 12.5. Datos obtenidos con un detector LIF para 15 aminoácidos.⁴ Reproducido, con permiso, de Y.-F. Cheng y N.J. Dovichi, *Science* **242**, 1988, 562-564. "Subattomole Amino Acid Analysis by Capillary Zone Electrophoresis and Laser-Induced Fluorescence". Copyright © 1988 by AAAS.

Aminoácido	Concentración ($\times 10^{-11}$ M)	Moles ($\times 10^{-20}$)	Moléculas
Ala	3,4	4,6	27.000
Arg	< 0,5	< 0,9	< 5.700
Asp	6,6	6,8	41.000
Cys	2,4	3,3	20.000
Glu	2,6	2,8	17.000
Gly	2,8	3,7	22.000
Ile	1,7	2,5	15.000
Leu	7,0	10	61.000
Lys	8,6	15	90.000
Met	1,6	2,3	14.000
Ser	1,6	2,3	13.000
Thr	2,6	3,7	22.000
Trp	1,1	1,7	9.900
Tyr	1,1	1,4	8.400

Tabla 12.2. Límites de detección observados para cada aminoácido. Reproducido, con permiso, de J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong y C.M. Whitehouse, *Science* **246**, 1989, 64-71. "Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules". Copyright © 1989 by AAAS.

12.5.2 Detección por espectrometría de masas

Los detectores de espectrofotometría de masa para la electroforesis capilar son necesariamente detectores post-columna, y se deben interconectar al extremo catódico del tubo capilar. Estos detectores consisten en cuatro componentes principales: la *interfase*, que ensambla el tubo capilar a la *fuerza de iones*, la fuente de iones, que genera fragmentos iónicos a partir de las especies neutrales del analito, el *analizador de masas*, que distingue los iones por sus valores de masa/carga (m/z), y del *detector de iones*, que mide y amplifica la señal. Los principios y la instrumentación de la espectrometría de masas bioanalítica son explicados en el Capítulo 15.

Los métodos suaves de ionización producen pocos fragmentos bajo condiciones relativamente suaves. El método de ionización que ha recibido la mayoría de la atención en términos de su aplicabilidad al análisis de proteínas y de DNA es la técnica denominada *ionización por electroespray* (ES). Este es un método suave que es capaz de generar los iones moleculares de las macromoléculas biológicas presentes en solución. La Tabla 12.3 da ejemplos de la carga y los rangos de m/z que se han observado con algunas especies biopoliméricas en espectrómetros de masa con ionización por electroespray.

Compuesto	MW	Rango de carga	Rango m/z
Insulina	5.730	4 - 6	950 - 1450
Citocromo c	12.400	12 - 21	550 - 1100
Alcohol deshidrogenasa (subunidad)	39.800	32 - 46	800 - 1300
Conalbúmina	76.000	49 - 64	1200 - >1500
Oligonucleótido (CATGCCATGGCATG)	4.260	6 - 11	350 - 710

Tabla 12.3. Carga y valores de m/z obtenidos para macromoléculas biológicas utilizando ES-MS.⁵

Debido al rango de los valores de m/z producidos por una especie de masa constante, se ha desarrollado un software sofisticado para procesar la información obtenida con ES-MS, permitiendo que los pesos moleculares de macromoléculas sean determinados con una muy alta precisión y exactitud. Debido a que los pesos moleculares son muy grandes, las abundancias relativas de los isótopos naturales deben ser consideradas al analizar datos de m/z . Las señales para una sola especie original son observadas en un rango de valores de m/z debido a esta distribución isotópica. Estos tópicos se consideran en el Capítulo 15.

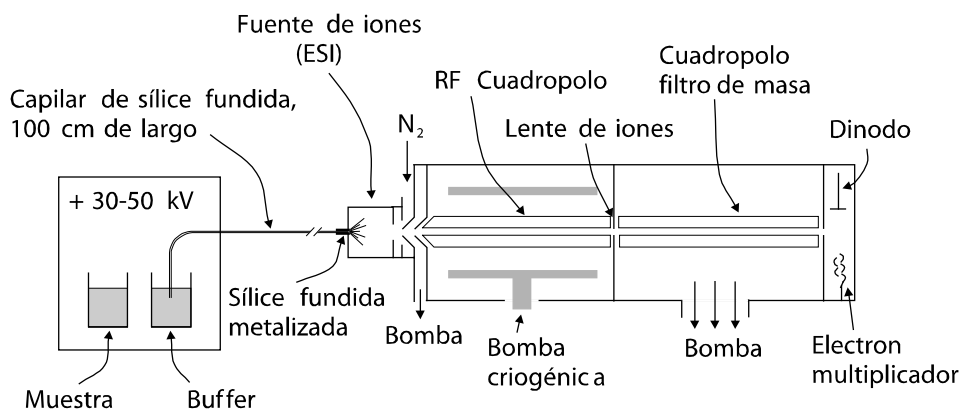


Figura 12.6. Instrumentación típica para CZE-ES-MS.⁶ Reproducido, con permiso, de R.D. Smith, J.A. Olivares, N.T. Nguyen y H.R. Udseth, *Anal. Chem.* **60** (N° 5), 1988, 436-441. © 1988 by American Chemical Society.

Equipos ES-MS han sido interfaseados al extremo catódico de los tubos capilares usados para la electroforesis capilar. La Figura 12.6 muestra un diagrama de un instrumento típico,

5. J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong y C.M. Whitehouse, *Science* 246, 1989, 64-71.

6. R.D. Smith, J.A. Olivares, N.T. Nguyen y H.R. Udseth, *Anal. Chem.* 60, 1988, 436-441.

mientras que la Figura 12.7 muestra un diagrama esquemático detallado de un tipo de interfaz entre un tubo capilar y la fuente de ionización. El diseño de la interfaz es crítico, y ha sido un campo de investigación muy activo. Con el dispositivo que se observa en la Figura 12.7, los parámetros operacionales son los que se describen a continuación. El potencial de separación, aplicado entre los extremos anódicos y catódicos del tubo capilar, se establece entre +30 y +50 kV, y el cátodo se mantiene a entre 3 y 6 kV sobre el potencial de tierra. El anillo de enfoque se mantiene a +300 V, mientras que se ponen a tierra el inyector y la desnatadora (skimmer) de la fuente de iones. Este arreglo eléctrico asegura la formación y la aceleración de iones dentro del sector magnético.

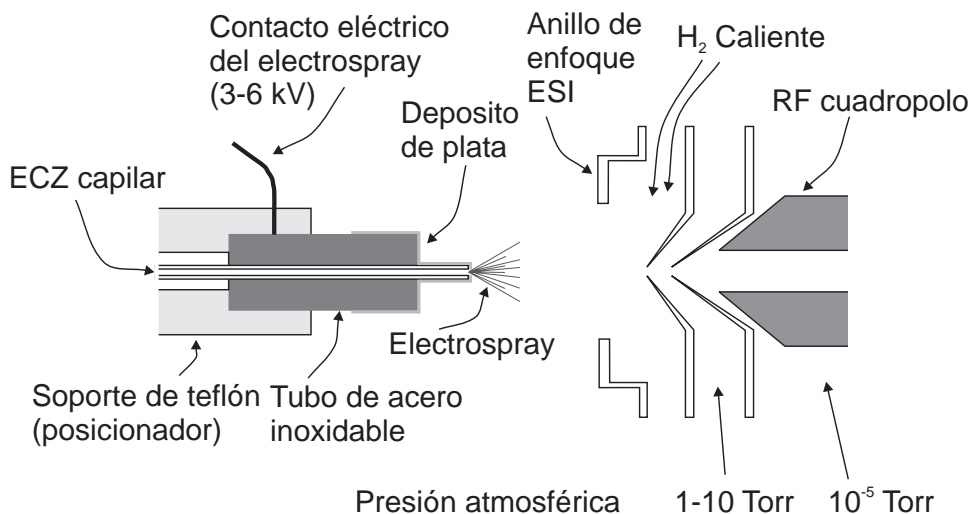
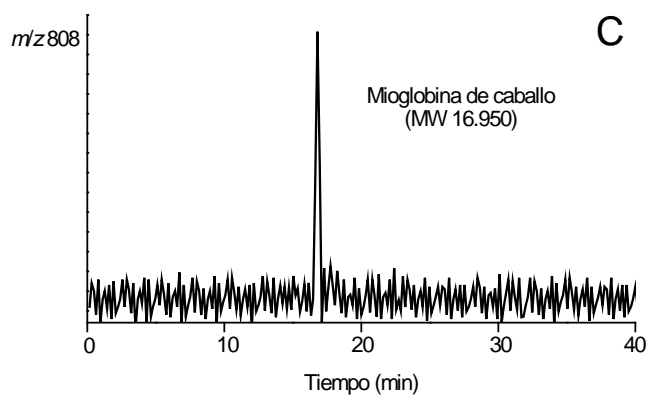
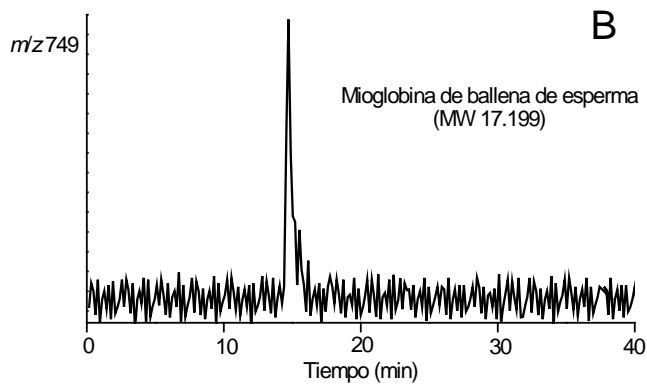
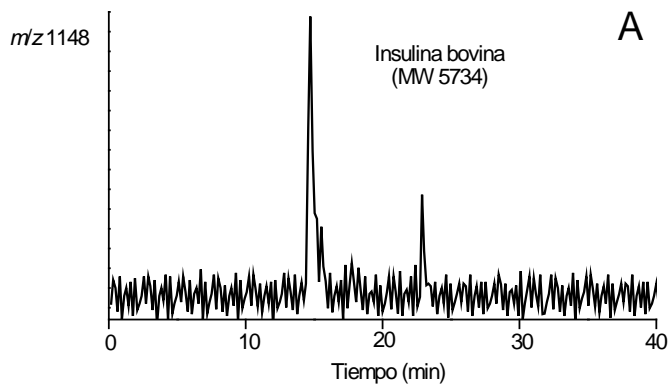


Figura 12.7. Fuente de ionización para CZE-MS, utilizada para analitos proteicos.⁶ Reproducido, con permiso, de R.D. Smith, J.A. Olivares, N.T. Nguyen y H.R. Udseth, *Anal. Chem.* **60** (N° 5), 1988, 436-441. © 1988 by American Chemical Society.

La detección puede proceder monitoreando un valor particular de m/z , lo que produce el denominado “electroferograma de ión simple” (“single-ion electropherogram”). Estos pueden obtenerse a diversos valores de m/z , por ejemplo, con un valor de m/z monitoreado para cada especie del interés en la muestra, de tal manera de obtener una dimensión adicional en selectividad. Los datos se pueden entonces combinar para mostrar un “electroferograma de ión reconstruido” (“reconstructed ion electropherogram”) que muestra la separación de todos los componentes. Esto se observa en la Figura 12.8, para una separación de insulina bovina, así como de mioglobina proveniente de corazón de caballo y de ballena de esperma.



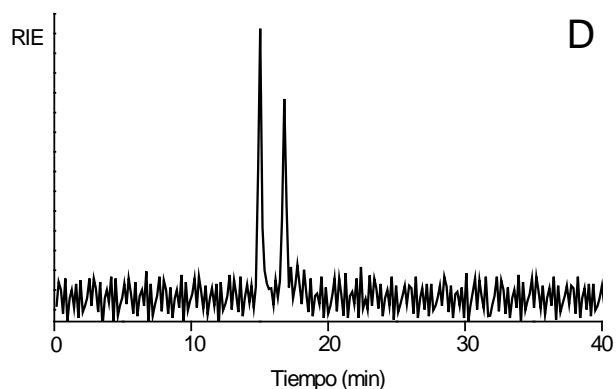


Figura 12.8. Ión electroferogramas producidos por CZE-MS; simple (A–C) y reconstruido (D).⁶

12.5.3 Detección amperométrica

Dos dificultades en el desarrollo de métodos electroquímicos para la detección en CE debieron ser superadas. El primer problema es superar la interferencia o interacción que resulta de los altos voltajes utilizados en separaciones por CE. Estos voltajes de corriente continua pueden ser tan altos como 50 kV, y las corrientes electroosmóticas resultantes pueden ser hasta 6 órdenes de magnitud mayores que las corrientes faradaicas medidas en un detector amperométrico polarizado a solo algunos cientos de milivoltios. Debido a esto, las tentativas iniciales dieron lugar a una señal en el detector amperométrico que era abrumadoramente superada por las señales de fondo. El segundo problema se relaciona con el pequeño tamaño de la salida del capilar y los pequeños volúmenes de flujo en la columna, que no son favorables para los detectores amperométricos convencionales utilizados en equipos de HPLC.

El primer problema ha sido superado con el uso de un interfaz eléctricamente aislado en el depósito catódico de la solución tampón. Este interfaz es poroso, y conecta el tubo capilar utilizado en la separación con un tubo capilar de detección. El contacto poroso permite el uso de potencial de tierra en el depósito catódico, y aísla eléctricamente el tubo capilar de la detección del voltaje aplicado para la separación. El tubo capilar de detección conduce a la solución del analito al detector compuesto por dos electrodos. Un diagrama de la disposición instrumental se muestra en la Figura 12.9.

El segundo problema se ha superado con el uso de ultramicroelectrodos como electrodos de trabajo. Estos dispositivos, hechos inicialmente de fibras del carbón, son de entre 5-50 μm de diámetro, y este tamaño pequeño permite su inserción en la salida del capilar. El eluyente fluye alrededor del electrodo de trabajo, en una solución tampón externa que contiene un electrodo de referencia. El tamaño pequeño del electrodo de trabajo lo hace invisible al

ojo humano, así que un microscopio y un micromanipulador se utilizan para la colocación exacta del electrodo en el tubo capilar de detección. Un sistema de dos electrodos se utiliza porque las corrientes medidas son muy pequeñas, y no da lugar a la deriva del electrodo de referencia que ocurre a menudo cuando son medidas corrientes importantes, haciendo un electrodo auxiliar (también llamado contraelectrodo) innecesario.

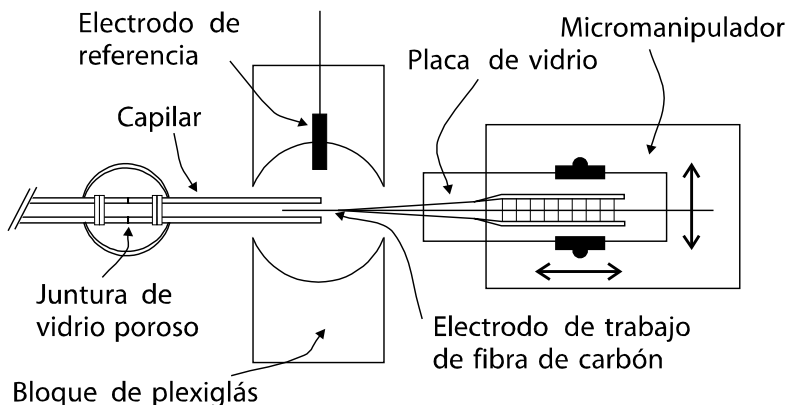


Figura 12.9. Detector de CE amperométrico con aislamiento catódico y ultramicroelectrodo.⁷ Reproducido, con permiso, de R.A. Wallingford y A.G. Ewing, *Anal. Chem.* **60** (N° 3), 1988, 258-263. "Amperometric Detection of Catechols in Capillary Zone Electrophoresis with Normal and Micellar Solutions". © 1988 by American Chemical Society.

El sistema que se observa en la Figura 12.9 fue utilizado con un tubo capilar de detección de 26 μm de diámetro interno para la detección de catecolaminas, y límites de detección de entre 200-500 amol fueron obtenidos (para $S/N=2$). Cuando el diámetro capilar fue reducido a 12,7 μm , el mismo electrodo de trabajo de fibra del carbón de 5 μm produjo un límite de detección del entre 5-25 amol, casi dos órdenes de magnitud más bajo. La mejora resulta del aumento de la eficacia de la colección del electrodo de trabajo. El tubo capilar más pequeño permite que menos analito salga del tubo capilar sin reaccionar electroquímicamente.⁷ Este resultado contrasta con los obtenidos utilizando detectores ópticos, donde los límites de detección empeoran para tubos capilares más pequeños debido a que menos analito se encuentra en la trayectoria del pincel óptico.

Usando un microinyector para micromuestreo electrocinético, este instrumento ha sido utilizado para la detección de las catecolaminas presentes en el líquido intracelular de células nerviosas únicas.⁸ La Figura 12.10 muestra un diagrama de un aparato de inyección y un electroferograma generado con un electrodo de trabajo polarizado a +750 mV versus

7. R.A. Wallingford y A.G. Ewing, *Anal. Chem.* 60, 1988, 258-263.

8. R.A. Wallingford y A.G. Ewing, *Anal. Chem.* 60, 1988, 1972-1975.

XII. ELECTROFORESIS CAPILAR

un electrodo de calomel saturado de sodio (SSCE, $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$, NaCl (sat.)), para oxidar las catecolaminas.

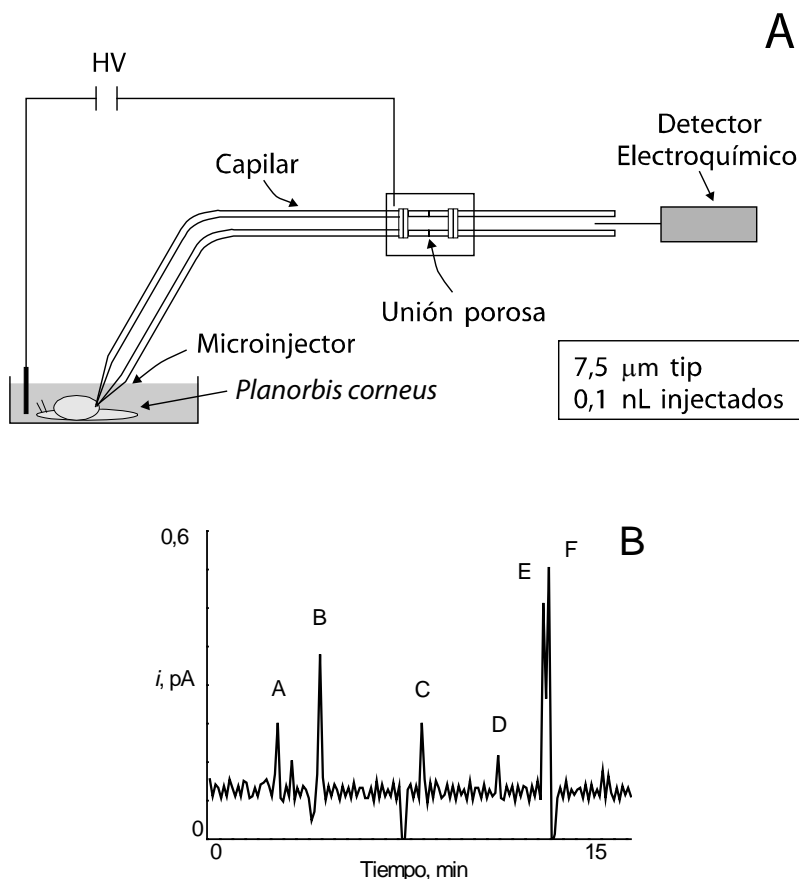


Figura 12.10. (A) Microinyector electrocinético y (b) electroferograma generado mediante remoción y separación de muestras del citoplasma de células nerviosas únicas de *Planorbis corneus*, un caracol de laguna.⁸ Reproducido, con permiso, de R.A. Wallingford y A.G. Ewing, *Anal. Chem.* **60** (N° 18), 1988, 1972-1975. "Capillary Zone Electrophoresis with Electrochemical Detection in 12.7 μm Diameter Columns". © 1988 by American Chemical Society.

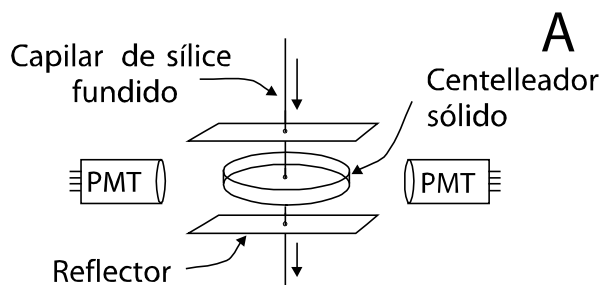
Hasta la fecha, los detectores amperométricos se han aplicado solamente para la detección de especies de tamaños pequeños y fácilmente oxidables. Sin embargo, una variedad de sistemas amperométricos para la detección de moléculas de mayor tamaño están en desarrollo, incluyendo amperometría indirecta. Con esta técnica, la solución tampón utilizada en la separación contiene una especie redox activa, que puede ser detectada continuamente por el ultramicroelectrodo. El analito desplaza la especie electroactiva, por lo que disminuye la respuesta electroquímica durante la elución de un pico de analito.

12.5.4 Detección radioquímica⁹

Los detectores radioquímicos usados en CE se han desarrollado para probar la aplicación de CE a técnicas convencionales de secuenciación de DNA, donde la detección de ^{32}P proporciona la información de la secuencia (véase la Sección 10.8). El ^{32}P se desintegra según la Eq. 12.11, emitiendo una partícula β (electrón) que se puede detectar utilizando centelleadores.



El tiempo de vida media del ^{32}P es de 14,3 días, y la energía media de los electrones emitidos es de 0,57 MeV, con algunos electrones poseyendo energía en exceso de 1 MeV. Con esta energía, los electrones emitidos pueden viajar hasta 2 mm en una solución acuosa, o 0,95 mm en sílice fundida. Por ello, las partículas β emitidas pueden penetrar las paredes de los capilares, y logran entrar en un centelleador sólido, donde su energía se convierte en fotones. Esta luz es perceptible utilizando tubos fotomultiplicadores convencionales (PMTs). Un detector radioquímico de coincidencia se muestra en la Figura 12.11, donde se utilizan dos PMTs, uno a cada lado del centelleador sólido. Este detector solo registra un evento de desintegración radiactiva (CPM) cuando ambos PMTs detectan el fenómeno luminoso simultáneamente, y de esta manera se elimina en gran medida el ruido o señal de fondo (producida por radiación de fondo que impacta en el centelleador o ruido eléctrico) que ocurre cuando un evento es detectado por un único PMT. Una separación mediante CE de citosina, adenosina y guanosina trifosfato marcados con ^{32}P , en la que se empleó un detector de coincidencia, también puede observarse en la Figura 12.11.



9. S.L. Pentoney, Jr., R.N. Zare y J.F. Quint en "Analytical Biotechnology: Capillary Electrophoresis and Chromatography" C. Horváth y J.F. Nikelly Eds., American Chemical Society, Washington DC, 1990.

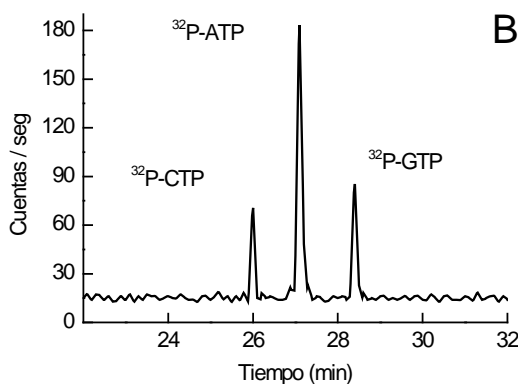


Figura 12.11. (A) Detector radioquímico de coincidencia para CE, y (B) resultados de la separación de $^{32}\text{P-CTP}$, $^{32}\text{P-ATP}$ y $^{32}\text{P-GTP}$.⁹ Reproducido, con permiso, de S.L. Pentoney, Jr., R.N. Zare y J.F. Quint en “*Analytical Biotechnology: Capillary Electrophoresis and Chromatography*” C. Horváth and J.F. Nikelly Eds., ACS Symposium Series 434, American Chemical Society, Washington DC, 1990. Copyright © 1990 by American Chemical Society.

12.6 Electroforesis capilar en gel de poliacrilamida (C-PAGE)¹⁰

Se han preparado geles de poliacrilamida dentro de tubos capilares, y las separaciones por CE realizadas con estos tubos capilares muestran que la electroósmosis es prácticamente eliminada en estas condiciones, y separaciones basadas en tamizado molecular pueden ser realizadas. C-PAGE ha sido utilizada para la secuenciación de DNA, en una variedad de configuraciones, una de ellas será considerada en esta sección.

El método del dideoxy de secuenciación de DNA comienza con la desnaturalización del DNA doble hélice (dsDNA) en DNA de cadena simple. El ssDNA entonces se incuba con un *primer* marcado con una sonda fluorescente, produciéndose la hibridación entre ambos. Los primers son oligonucleótidos compuesto por unas 20 bases. El heteroduplex formado es entonces incubado en cuatro reacciones separadas.

Cada mezcla de reacción contiene el heteroduplex, DNA polimerasa, una mezcla de las cuatro especies del dNTP (N = G, A, T o C), y una pequeña cantidad de uno de los cuatro dideoxynucleotidos trifosfatos (ddNTP), donde el grupo 3'-OH no está presente. La relación dNTP:ddNTP es alta, cerca de 1200:1. La DNA polimerasa extiende secuencialmente el primer, con las bases complementarias a los presentes en el filamento opuesto, pero se

10. H. Swerdlow, J.Z. Zhang, D.Y. Chen, H.R. Harke, R. Grey, S. Wu, N.J. Dovichi y C. Fuller, *Anal. Chem.* 63, 1991, 2835-2841.

detiene cuando una de las especie del ddNTP es incorporado. Esto produce una mezcla de distintas longitudes de fragmentos, todas marcadas, donde la polimerización se ha detenido en un tipo particular de base, como resultado de la incorporación del ddNTP particular usado en la reacción. Los cuatro productos individuales entonces son mezclados con la siguiente relación de volúmenes, 8:4:2:1, para los productos de reacción del dideoxy de A:C:G:T. Después de la separación utilizando C-PAGE, el marcador de fluorescencia se detecta vía fluorescencia inducida por láser en una cubeta de flujo (sheath-flow cuvette), y la secuencia es leída utilizando las *intensidades* de los picos.

El tubo capilar de separación es preparado polimerizando 6%T, 5%C monómeros con 30% de formamida y urea 7 M dentro de un capilar de sílice fundida de 37 cm de largo y 50 μm de diámetro. Se utilizó inyección electrocinética, aplicando 200 V/cm durante 30 segundos; debe tenerse en cuenta que el método de inyección hidrodinámica no funciona en los tubos capilares rellenos de gel. La separación en el gel ocurre por filtración molecular, de modo que los fragmentos más cortos son eluidos primero. La Figura 12.12 muestra los datos obtenidos usando un marcador fluorescente TAMRATM, el que puede ser excitado a 543,5 nm y emite a 590 nm. Este método tiene un límite de detección del 2 zmol (1 zmol = 10^{-21} mol) para cada fragmento.

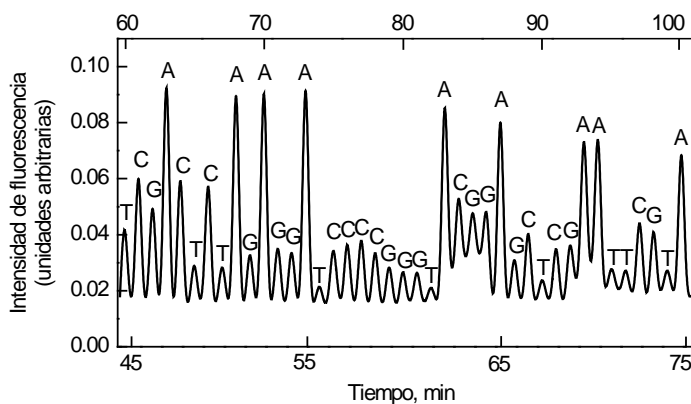


Figura 12.12. Porción del electroferograma C-PAGE generado por la reacción de dideoxy para la secuenciación de una muestra de DNA, utilizando un primer marcado con TAMRA 18-mer, y detección por fluorescencia inducida por láser. La secuencia es asignada basándose en las intensidades máximas, que son 8:4:2:1 según los volúmenes relativos de los cuatro productos de la reacción combinados en la muestra.¹⁰ Reproducido, con permiso, de H. Swerdlow, J.Z. Zhang, D.Y. Chen, H.R. Harke, R. Grey, S. Wu, N.J. Dovichi y C. Fuller, *Anal. Chem.* **63**, 1991, 2835-2841. “Three DNA Sequencing Methods Using Capillary Gel Electrophoresis and Laser-Induced Fluorescence”. © 1991 by American Chemical Society.

12.7 Enfoque isoeléctrico capilar (CIEF)¹¹

El enfoque isoeléctrico es una técnica de estado estacionario, y su uso en tubos capilares requiere la supresión parcial o total del flujo electroosmótico. Los tubos capilares usados para CIEF se pueden derivatizar con metilcelulosa o poliacrilamida lineal, para bloquear los grupos silanol superficiales, cuya ionización es responsable de flujo electroosmótico. Una mezcla que contiene la muestra y los anfolitos es entonces cargada a través del tubo capilar, y se aplica el campo eléctrico utilizando soluciones (tampones) ácidas en el ánodo y básicas en el cátodo. La corriente disminuye con el tiempo, y alcanza un mínimo cuando la corrida electroforetica es completa, momento en que el patrón de la separación ha sido enfocado y permanece estático.

Una técnica llamada *movilización por sal* (salt mobilization) se puede utilizar para eluir las bandas enfocadas de las proteínas. El campo eléctrico se desconecta, y una de las soluciones de los reservorios se cambia por una solución con carácter ácido (o básico) más un catión (o anión) diferente al H^+ (u OH^-). Cuando el campo eléctrico es conectado nuevamente, la alta concentración salina altera el movimiento de los H^+ (u OH^-) dentro del tubo capilar. El resultado es que el gradiente entero de pH, tanto las bandas proteicas como los anfolitos, se mueven hacia el reservorio que tiene alta concentración salina y el patrón de la separación enfocado puede ser eluido a través de un detector.

Este método se ha probado con una variedad de tubos capilares de sílice covalentemente modificados. Se ha encontrado que los tubos capilares derivatizados tienden para ser inestables si valores de pH superiores a 7,5 son utilizados, y son especialmente inestables cerca del extremo catódico.

Un método alternativo, propuesto recientemente, implica el uso de modificantes en las soluciones tampón utilizadas en la corrida electroforética, donde los modificantes obran recíprocamente con las paredes capilares para reducir, pero para no eliminar, el flujo electroosmótico. Entonces, una migración lenta y continua hacia el detector ocurre durante la corrida. Usando 0,1% metilcelulosa como modificante, especies que tienen valores de pI que difieren solo en 0,01 unidades de pH pueden ser separadas. La Figura 12.13 muestra tal separación, usando un tubo capilar de sílice fundido de 40 cm y 75 μm sin recubrimiento, operando a 30 kV. Una solución de anfolitos (5%) y la muestra (1 mg/mL de cada proteína) en la solución tampón es cargada en el capilar. El uso del campo eléctrico da lugar a una separación lenta, continua y a la detección debido al lento flujo electroosmótico. Con este método, no se requiere movilización por sal.

11. J.R. Mazzeo y I.S. Krull, *Anal. Chem.* 63, 1991, 2852-2857.

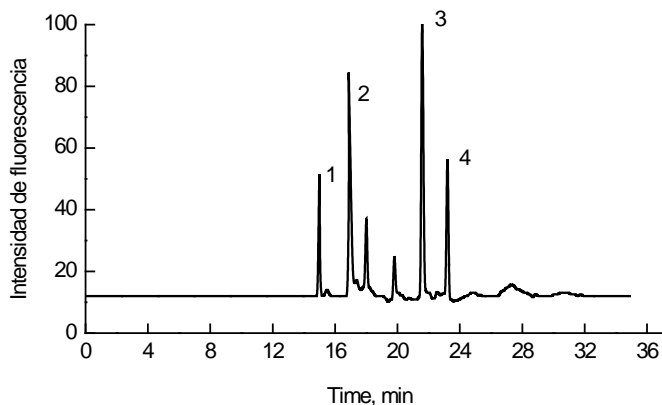


Figura 12.13. CIEF del citocromo c (pico 1, pI 9,6), quimotripsinogeno A (pico 2, pI 9,0) y mioglobina (picos 3 y 4, pI 7,2 y 6,8) sobre un capilar sin derivatizar, de 75 μm de diámetro interno, 60 cm de largo y 40 cm desde el ánodo al detector. Anolito: ácido fosfórico 10 mM; catolito: NaOH 20 mM.

La solución tampón de corrida contiene 0,1% metilcelulosa, 1% TEMED y 5% Pharmalyte 3-10 carrier anfóteros. Detección en UV, 280 nm.¹¹ Reproducido, con permiso, de J.R. Mazzeo y I.S. Krull, *Anal. Chem.* **63** (N° 24), 1991, 2852-2857. "Capillary Isoelectric Focusing of Proteins in Uncoated Fused-Silica Capillaries Using Polymeric Additives". © 1991 by American Chemical Society.

12.8 Lecturas sugeridas

- C. Horvath y J.F. Nikelly, Eds., "Analytical Biotechnology: Capillary Electrophoresis and Chromatography", American Chemical Society, Washington DC, 1990.
- O.W. Reif, R. Lausch y R. Freitag en "Advances in Chromatography", Vol. 34, P. R. Brown y E. Grushka, Eds., Marcel Dekker, New York, 1994. pp. 1-56. (ver también Capítulo 4, por Z. El Rassi, pp. 177-250).
- D. Schmalzing, S. Buonocore y C. Piggee, Capillary Electrophoresis-Based Immunoassays, *Electrophoresis* 21, 2000, 3919-3930.

12.9 Problemas

1. Un experimento de CZE fue realizado usando un tubo capilar abierto de sílice con un diámetro de 50 μm , 50 centímetros de largo. Una solución tampón de carbonato 5 mM, pH 10 fue utilizada, con un voltaje de separación de 25 kV, luego de que la muestra fue inyectada

electrocinéticamente por 15 segundos, a 1 kV, de una mezcla de aminoácidos derivatizados con FITC. La detección se realizó mediante fluorescencia inducida por láser y demostró que la mezcla contenía tres componentes principales, con tiempos de elución de 4,5; 6,3 y 10,2 minutos. Cómo se esperaría que cambiaran estos tiempos de elución si:

- (a) La longitud del tubo capilar fue aumentada a 1 metro,
- (b) El voltaje de la separación fue aumentado a 50 kV, y
- (c) Una longitud de 1 metro y un voltaje de 50 kV fueron utilizados.

2. Los tubos capilares de sílice sin tratamiento demuestran una deriva catódica de la solución tampón, de tal manera de que se observa un flujo de la solución tampón desde el compartimiento anódico hacia el extremo catódico del capilar, permitiendo que un detector sobre la columna sea colocado cerca del extremo catódico del tubo capilar. ¿En qué extremo del tubo capilar debería colocarse un detector si la superficie interna de grupos silanoles del tubo capilar ha sido modificada covalentemente con aminopropiltri(etoxi)silano, “APTES” (ver Capítulo 4)?

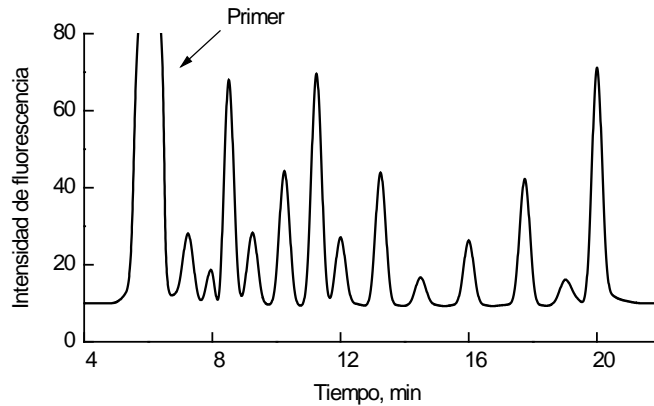
3. Bajo condiciones ácidas, un analito proteico de peso molecular desconocido se sabe que posee carga positiva múltiple, entre +5 y +8. Una mezcla que contenía esta proteína y otras fue sometida a electroforesis capilar en una solución 10 mM en ácido trifluoroacético, y el eluido del tubo capilar fue alimentado directamente en el sistema de ionización (electrospray) de un espectrómetro de masas. Cuando la proteína eluye del tubo capilar, el rango m/z del detector del espectrómetro de masa fue explorado, y se observaron picos en los valores de m/z de 938, 1071, 1250 y 1500. ¿Cuál es el peso molecular de la proteína?

4. Los límites de detección obtenibles con la mayoría de los detectores de CE aumentan (deterioran) cuando el diámetro de los capilares disminuyen. Sin embargo, los detectores amperométricos basados en ultramicroelectrodos se comportan de la manera opuesta, con límites de detección mejorados para diámetros capilares más pequeños, permitiendo que cantidades más pequeñas de muestra sean utilizadas. Sugiera una reacción de derivatización pre-columna, que se podría utilizar para permitir la detección electroquímica de los aminoácidos obtenidos luego de una separación de CZE.

5. ¿Cuál es la ventaja principal de usar un detector radioquímico de coincidencia en CE sobre uno que utiliza un único fotomultiplicador?

6. El electroferograma C-PAGE graficado abajo (Figura 12.14) fue obtenido después de la separación de los productos de las reacciones de secuenciación de DNA del dideoxy (Sanger) para un polideoxinucleotido. Un primer de 12 bases marcado con fluoresceína isotiocianato fue utilizado para iniciar las cuatro reacciones de la DNA-polimerasa en la dirección $3' \rightarrow 5'$. Los productos de las cuatro reacciones que incluyen ddGTP, ddATP,

ddCTP y ddTTP fueron mezclados respetando la siguiente relación de volumen, 8:4:2:1, respectivamente. Con el electroferograma, determine la secuencia de las primeras 13 bases que siguen al primer. Recordando que la secuencia del polideoxinucleotido original es complementaria a la secuencia de los productos de la reacción del dideoxy detectados, dé la secuencia 5'→3' de esta sección del polideoxinucleotido original.



7. Un experimento de enfoque isoelectrico capilar fue realizado en un tubo capilar de 75 μm de diámetro interno, donde los silanoles superficiales habían sido derivatizados con poliacrilamida lineal. Una mezcla de proteínas que tenían valores de pI entre 6 y 8 fue enfocada usando anfolitos que cubrían la gama de pH 3-10, usando como anolito HCl 20 mM y como catolito NaOH 20 mM. Un patrón estático de separación fue indicado por un mínimo de corriente que ocurrió después de 90 minutos y a 15 kV. ¿Cómo se podría utilizar la movilización salina para eluir el patrón de la separación en el extremo anódico del tubo capilar?

CAPÍTULO 13

CENTRIFUGACIÓN

13.1 Introducción

La sedimentación gravitacional es un método de separación bien conocido. Empíricamente fue utilizada por miles de años, por ejemplo para separar partículas de oro de la arena. Las partículas que están en suspensión en un líquido sufren los efectos de diversas fuerzas. Si la partícula tiene una densidad más alta que el líquido en el cual se sumerge, tiende a migrar hacia abajo, siguiendo la dirección de la fuerza de la gravedad. La fuerza friccional actúa resistiéndose al movimiento (Figura 13.1). La velocidad de sedimentación depende del tamaño, forma y masa de las partículas, así como de la viscosidad y densidad del líquido. La denominada “difusión hacia atrás” (back diffusion), una fuerza que depende del gradiente de concentración, actúa como contrapeso de la tendencia a la precipitación.

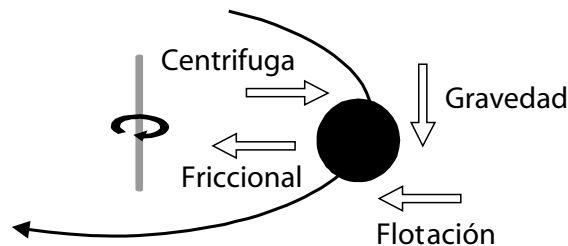


Figura 13.1. Fuerzas que actúan sobre una partícula durante la centrifugación. La fuerza gravitacional no es considerada a los fines prácticos, puesto que su efecto es muy pequeño en comparación con la fuerza centrífuga, inclusive en centrífugas de baja velocidad.

La definición de “partícula” en este contexto es muy amplia, y refiere a cada sustancia disuelta o en suspensión en el medio, de dimensiones microscópicas o macroscópicas; esto incluye todo excepto el solvente donde las partículas se hayan suspendidas. Las partículas separadas y estudiadas con la ayuda de esta técnica en bioquímica son células, organelas subcelulares y biomoléculas grandes, como el DNA y las proteínas.¹

1. Hsien-Wen Hsu, “*Separation by Centrifugal Phenomena*”, “*Techniques of Chemistry Vol. XVI*”, John Wiley & Sons, New York, 1981. p. 111.

Los métodos de centrifugación se basan en los efectos de campos de fuerza más intensos que la fuerza gravitacional, para acelerar los procesos que ocurrirían de otra manera en una escala de tiempo no utilizable en la práctica (meses u años). Por otra parte, la superación de fuerzas de difusión permite la precipitación de moléculas pequeñas que no precipitarían en nuestro campo gravitacional terrestre.

13.2 Sedimentación y fuerza centrífuga relativa, g

Usando la ley de Stokes, es posible calcular la velocidad de sedimentación (v) para una partícula.² La velocidad de sedimentación es el resultado de dos fuerzas, la fuerza gravitacional (o centrífuga) que mueve la partícula hacia abajo, y la fuerza friccional o de fricción, resistiendo su movimiento a través de la solución. La ley de Stokes es válida para partículas esféricas que alcanzan una velocidad constante:

$$v = \frac{d^2 (\rho_p - \rho_m)}{18 \mu} \times g, \quad [13.1]$$

donde d es el diámetro de la partícula, ρ_p es la densidad de la partícula, ρ_m es la densidad del medio, μ es la viscosidad del medio y g es el campo de fuerza centrífuga. De esta ecuación, puede observarse que la velocidad de sedimentación de una partícula es proporcional al cuadrado del diámetro de la partícula. Además, la velocidad de sedimentación es proporcional a la diferencia entre la densidad de la partícula y la densidad del medio, y si esta diferencia es cero, la velocidad de sedimentación se convierte en cero. Puede también observarse que esta velocidad aumenta con el aumento del campo de fuerza y cuando la viscosidad disminuye.

La fuerza centrífuga relativa (RCF) se define como el campo de fuerza aplicado respecto al campo gravitacional terrestre; la Ecuación 13.2 muestra su definición:

$$\text{RCF} = \frac{F_{\text{centrífuga}}}{F_{\text{gravedad}}} = \frac{m\omega^2 r}{mg} = \frac{\omega^2 r}{g}, \quad [13.2]$$

donde r es la distancia entre el centro de rotación y la partícula, en cm; ω es la velocidad de rotación en rad/sec y m es la masa de la partícula. La velocidad en las centrifugas

2. D. Rickwood y G.D. Birnie en "*Centrifugal Separations in Molecular and Cell Biology*". G.D. Birnie y D. Rickwood Eds., Butterworths, London, 1978. pp. 1-3.

se expresa generalmente en revoluciones por el minuto (RPM), y si $g = 980 \text{ cm/seg}^2$, se puede escribir:

$$\frac{\omega^2}{g} = \frac{[(2\pi)(\text{rpm})/60]^2}{980} \quad [13.3]$$

$$= 1,119 \times 10^{-5} (\text{rpm})^2. \quad [13.4]$$

Entonces,

$$\text{RCF}(g) = 1,119 \times 10^{-5} (\text{rpm})^2 r. \quad [13.5]$$

Puesto que RCF es un cociente entre dos fuerzas, es adimensional; sin embargo, es habitual seguir el valor numérico de RCF con el símbolo g . En los tubos de centrífuga, la distancia r aumenta desde la tapa del tubo al fondo, de modo que es útil definir una aceleración media (g_{av}) para un rotor y una velocidad dados, así como una aceleración mínima en la tapa del tubo y una fuerza máxima en el fondo del tubo (g_{min} y g_{max} , respectivamente).

Partículas biológicas. La ley de Stokes se aplica a partículas esféricas, que son grandes en comparación con las moléculas que componen el medio líquido en el que encuentran, y que están presentes en una concentración suficientemente baja como para no modificar la viscosidad del líquido. La mayoría de las partículas biológicas no son esféricas, por lo que esta ley debe modificarse para tomar en cuenta esta variable. Un acercamiento a este problema debe considerar que las formas de las partículas biológicas pueden aproximarse a “elipsoides de revolución”, o esferoides con un eje mayor y uno menor. Los cálculos demuestran que la fuerza friccional sobre estos elipsoides es mayor que la esperada para partículas esféricas del mismo volumen.³

Las condiciones de centrifugación se eligen según las características del material biológico. La composición química del medio, así como su temperatura deben ser controladas para evitar la desnaturalización. Además, la presión hidrostática generada por la fuerza centrífuga puede ser bastante grande como para permeabilizar las membranas celulares⁴ (afectado la densidad celular) o separando las asociaciones macromoleculares presentes originalmente en la muestra, como las presentes en proteínas formadas por subunidades. La fuerza centrífuga puede modificar también la forma molecular; en este caso la velocidad de sedimentación pasa a no depender en forma lineal de la fuerza g aplicada.

3. P. Sheeler, “*Centrifugation in Biology and Medical Science*”. John Wiley & Sons, New York, 1981. pp. 17-20.

4. V. Sitaramam y M.K.J. Sarma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1981, 3441-3445.

13.3 Fuerza centrífuga en diferentes tipos de rotor

Hay cuatro tipos básicos de rotores: los rotores de portatubos oscilantes (swinging-bucket), de ángulo fijo, verticales y zonales. El rotor vertical se podría clasificar como un rotor de ángulo fijo, en el cual el ángulo es extremo, pero la mayoría de los autores consideran que son bastante diferentes como para ser considerados por separado. Una descripción detallada de estos cuatro tipos de rotores y de sus especificaciones se puede encontrar en Rickwood.⁵

Los rotores zonales no serán descriptos detalladamente aquí, puesto que habitualmente son utilizados para técnicas preparativas (no analíticas) en las que se necesita centrifugar volúmenes importantes (estos rotores tienen capacidades típicas de 300-1700 mL), principalmente usados en centrifugación de velocidad-zonal. Básicamente, un rotor zonal consiste en dos secciones, que forman un cilindro, que atornillan sobre la otra. La muestra se vierte dentro del rotor sin el uso de tubos.

13.3.1 Rotores oscilantes

El tubo que contiene la muestra se inserta en un portatubo (bucket). Durante la aceleración del rotor, el porta tubo se reorienta desde la vertical (gravedad terrestre) a la posición horizontal (fuerza centrífuga). En la Figura 13.2 la dirección de la aceleración centrífuga es evidente, mostrando que las partículas en este rotor se mueven primero hacia las paredes del tubo, luego un movimiento conjunto de las partículas y el flujo convectivo acelera el proceso de precipitación (llamado el “efecto pared”). Este rotor se utiliza generalmente para las separaciones de velocidad-zonales. Observe que la trayectoria de la precipitación es a lo largo de la longitud del tubo de la centrifuga; por lo tanto, este método es relativamente ineficaz para separar por precipitación (dando lugar a la formación de un material aglomerado, denominado generalmente “pellet”).

13.3.2 Rotores de ángulo fijo

En este rotor los tubos de la muestra son introducidos en agujeros en un rotor sólido. El ángulo del tubo por lo tanto es constante durante la carga de las muestras, la centrifugación y la descarga. Cuando la fuerza centrífuga aumenta, la solución se reorienta dentro del tubo. Para un volumen de muestra dado, la trayectoria de la centrifugación con un rotor de ángulo fijo es más corta que cuando se utiliza un rotor oscilante. Las partículas alcanzan la pared del tubo más rápidamente, y después resbalan hacia abajo por la pared del tubo, formando

5. D. Rickwood Ed., “*Centrifugation-A Practical Approach*”, IRL Press, Oxford, 1984, pp. 295-304.

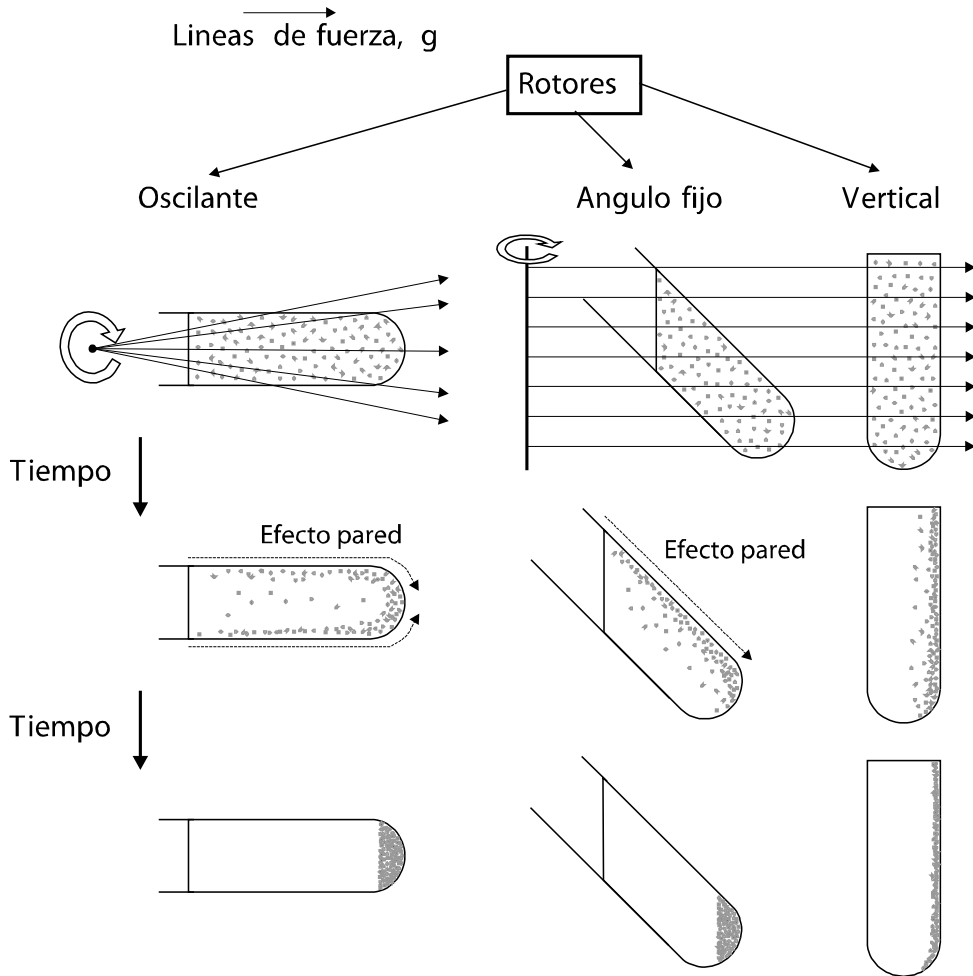


Figura 13.2. Fuerzas centrífugas en diversos tipos de rotor. El ángulo se mide con respecto el eje de rotación, esto significa que un rotor de ángulo fijo con un ángulo de 14° se parece a un rotor vertical, y por lo tanto la longitud del camino de sedimentación es más corta que en un rotor de 40° .

más rápidamente un pellet o precipitado (Figura 13.2). Estos rotors son más eficientes para protocolos como la centrifugación diferencial así como otros procedimientos basados en la obtención de un pellet, y pueden ser utilizados para experimentos isopícnicos, que son técnicas de equilibrio que utilizan gradientes de densidad, descriptas más adelante en este Capítulo. Cuando el ángulo del rotor es bajo, la trayectoria de la sedimentación es más corta, y se aumenta la eficacia de pelleteado. Los rotors de ángulo fijo están disponibles con ángulos de entre 14° y 40° .

13.3.3 Rotores verticales

En los rotores verticales (Figura 13.2) los tubos permanecen en posición vertical durante la centrifugación; durante la aceleración, al aumentar la fuerza g , la solución se reorienta. El proceso de la reorientación se explicará más adelante en este Capítulo. Por ahora, esto significa que en este rotor las tapas de los tubos son importantes, y deben poder soportar una importante presión hidrostática. La trayectoria de la sedimentación es la más corta de todas las clases de rotores descritos aquí (el diámetro del tubo), y la aceleración mínima, relacionada con el radio mínimo, es más grande para este tipo rotor, permitiendo separaciones más rápidas a velocidades más bajas. Estos rotores son la primera opción para la centrifugación isopícnica, se pueden utilizar para la centrifugación de velocidad-zonal, y nunca se utilizan para las técnicas relacionadas con la formación de un pellet, dado que la precipitación ocurre sobre todo un lado de la pared de los tubos, haciendo que el pellet se desprenda fácilmente.

13.4 Factor de clarificación (*Clearing Factor*)

La capacidad para formar pellets (precipitados) se relaciona con el valor del factor de clarificación (también denominado “factor k ”), una variable que se refiere a la capacidad de un sistema o rotor para separar o precipitar partículas. Valores más pequeños de k indican mayor eficacia. k se define de la siguiente manera:⁶

$$k = (t)(s)10^{13}, \quad [13.6]$$

donde t es el tiempo requerido en horas, y s es el coeficiente de sedimentación, definido como:

$$s = \frac{\ln(r_{\max}/r_{\min})}{\omega_2(t_2 - t_1)}, \quad [13.7]$$

donde ω es la velocidad angular en radianes/seg y la diferencia entre el radio máximo (r_{\max}) y el mínimo (r_{\min}) determina la trayectoria de la sedimentación. Cuando esta trayectoria es más corta, k es más pequeña. Una expresión más útil, donde la velocidad angular es substituida por la velocidad en RPM (y por lo tanto las unidades del tiempo son minutos) se muestra en la Eq. 13.8:

$$k = \frac{2,53 \times 10^{11} \ln(r_{\max}/r_{\min})}{\text{rpm}^2}. \quad [13.8]$$

El valor de k se informa como característico de un dado rotor, y se aplica a una partícula en agua pura a 20°C, a la velocidad máxima permitida para el rotor. Los valores de k_{actual} , correspondientes a velocidades de rotación más bajas pueden ser calculados utilizando la siguiente fórmula:

$$k_{\text{actual}} = k \left(\frac{\text{rpm}_{\text{max}}}{\text{rpm}} \right)^2, \quad [13.9]$$

Si el coeficiente de sedimentación de las partículas que se pretende sedimentar es conocido, puede hacerse una predicción aproximada del tiempo requerido para la separación, utilizando la ecuación siguiente:

$$t = \frac{k}{S}, \quad [13.10]$$

donde t es el tiempo requerido en horas y S el coeficiente de sedimentación en las unidades Svedberg. Esta fórmula es solamente una aproximación. Los valores de k se calculan para un medio de centrifugación con una viscosidad y densidad igual a la del agua. Un aumento en cualquiera de estos parámetros aumentará el valor de k cambiando el valor de la constante en la Eq. 13.8. Las simulaciones de computadora se pueden utilizar para predicciones más exactas de los tiempos de precipitación o separación en bandas usando medios sin gradiente de densidad. Con medios de centrifugación con gradiente, la viscosidad y la densidad son funciones de la posición, y un solo valor de k no puede ser aplicado; para predecir el tiempo de separación en bandas en esta situación, k' puede ser calculada para un determinado gradiente y una partícula bien caracterizada.⁶

13.5 Gradientes de densidad

La introducción del uso de gradientes de densidad permitió varias mejoras en las capacidades analíticas y preparatorias de los procesos centrífugos. Primero, es posible verter la muestra en la parte superior del tubo, en una capa más o menos delgada; las diferencias en densidad entre la muestra y el medio de separación evitan la convección y retrasan el proceso de homogeneización. En segundo lugar, es posible disminuir los movimientos de la convección en el tubo; la convección se puede producir por una diferencia en temperatura entre diversas piezas del rotor. Tercero, es posible “enfocar” una partícula cuando ella alcanza su propia densidad, en un proceso análogo a enfoque isoelectrico.

6. P. Sheeler, “*Centrifugation in Biology and Medical Science*”. John Wiley & Sons, New York, 1981, pp 169-176.

13.5.1 Materiales utilizados para generar un gradiente

Los gradientes de densidad se pueden generar en soluciones acuosas de muchos materiales. Las características deseables de un material ideal incluyen alta solubilidad en agua, alta densidad, baja viscosidad y baja presión osmótica, así como muy baja reactividad tanto química como fisiológica; transparencia a la radiación uv-visible también es deseable.⁷ Se describe aquí resumidamente aquellos materiales utilizados para producir gradientes en soluciones acuosas. Solamente en situaciones muy específicas se emplean gradientes en solventes no acuosos (como cloroformo o benceno). Información más detallada puede encontrarse el excelente libro de Price.⁸

Los materiales más utilizados para generar gradientes de densidad son sacarosa, Ficoll y sales de Cs. Las soluciones de sacarosa pueden tener una concentración tan elevada como el 65% p/p, con una densidad máxima de 1,32 g/cm³ a 4°C; sin embargo, las soluciones concentradas de sacarosa presentan una alta presión osmótica y viscosidad. Ficoll es una marca comercial para un polisacárido sintético con un MW promedio de 400.000 y una densidad máxima en solución acuosa de 1,23. Es muy útil para separar partículas sensibles a los cambios de presión osmótica, como las células de mamífero.

Las sales de cesio (principalmente CsCl y Cs₂SO₄) se pueden utilizar para producir gradientes auto-formados mediante la centrifugación durante un periodo prolongado (12 horas o más) de una solución salina homogénea. Estos gradientes se forman *in situ*, y las características del gradiente (variación de densidad respecto a la distancia) dependen del rotor y de la fuerza g aplicada. La densidad máxima puede ser muy alta: 1,9 y 2,1 g/cm³ para las sales de cloruro y de sulfato, respectivamente. Estas sales se utilizan típicamente para la preparación y el análisis de ácidos nucleicos y para la separación de plásmidos.

Partículas coloidales de sílice también han sido utilizadas para generar gradientes de densidad. Estas partículas son aproximadamente de 20 nm de diámetro, y están cubiertas a menudo con un material orgánico. Percoll, por ejemplo, es una marca comercial para partículas inertes de sílice recubiertas de polivinilpirrolidona. Las suspensiones de Percoll tienen las ventajas de ser no tóxicas, una baja viscosidad y presión osmótica, y son el material de elección para separar células y organelas subcelulares. Sin embargo, la densidad máxima de una suspensión de Percoll es solamente 1,2 g/cm³.

Los compuestos orgánicos yodados de alta densidad (por ejemplo iodixanol), derivados de aquellos utilizados como materiales de contraste en radiografías de rayos X pueden ser utilizados para aquellas aplicaciones que requieren densidades más altas que las obtenibles con Percoll (tan altas como 1,5 g/cm³) así como baja fuerza iónica y osmolaridad.

7. C.A. Price. "Centrifugation in Density Gradients", Academic Press, New York, 1982, p. 114.

8. C.A. Price. "Centrifugation in Density Gradients", Academic Press, New York, 1982, pp. 114-126.

13.5.2 Construcción de gradientes pre-formados y auto-formados

Hay varias maneras de generar un gradiente. Los gradientes discontinuos pueden ser formados al colocar sucesivamente alícuotas de una solución sobre otra de una densidad más alta, capa por capa. Estos gradientes discontinuos (4-6 capas) se pueden utilizar directamente, o bien se pueden transformar en gradientes más o menos lineales, permitiendo que la difusión actúe por determinado tiempo, o bien congelando y descongelando el gradiente discontinuo varias veces, logrando un efecto similar.

Un método que origina gradientes más reproducibles y se basa en la utilización de un dispositivo diseñado específicamente para producir los gradientes, llamados simplemente “generadores de gradiente”. Un generador de gradiente sencillo se presenta en la Figura 13.3, y puede ser utilizado para generar gradientes lineales o exponenciales. Los dos cilindros están conectados en su base; un cilindro contiene la solución más ligera (la solución con la concentración más baja de la sustancia formadora del gradiente) y el otro contiene la solución más concentrada o densa.

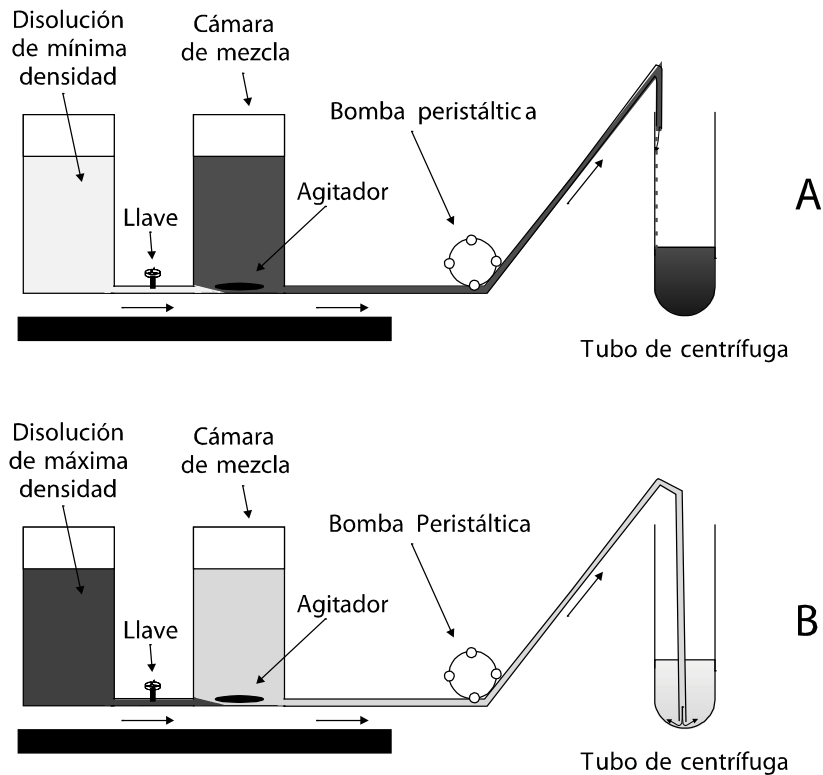


Figura 13.3. Dispositivo para generar gradientes de densidad. En A, la solución más densa está en el compartimiento de mezcla; por lo tanto, un gradiente de alta a baja densidad será formado, y el tubo de centrífuga se llena desde arriba. En B, las posiciones de las soluciones se invierten para generar un gradiente de baja a alta densidad: en este caso, el tubo de centrífuga se llena desde el fondo.

Para generar un gradiente lineal los dos compartimientos deben tener el mismo diámetro, y los niveles de la solución en los dos compartimientos deben seguir siendo aproximadamente iguales durante la generación del gradiente. Diversas formas de gradientes se pueden producir usando compartimientos con diámetros distintos, o utilizando bombas de pistones o bombas de jeringa. Sistemas automatizados se encuentran disponibles en el mercado, que incluyen formadores de gradiente así como la capacidad de coleccionar un gradiente luego de la separación por centrifugación, así como la medida *on-line* de la absorbancia (u otro parámetro óptico) y la colección de las fracciones separadas.

Los gradientes se pueden también producir por la centrifugación de una solución formadora de gradiente homogénea, tal como una solución acuosa de CsCl. Los gradientes auto-generados son muy reproducibles y confiables, pero no se utilizan con frecuencia, debido a que los gradientes generados de esta manera no poseen un rango de densidades suficientemente ancho.

13.5.3 Redistribución del gradiente en rotores de ángulo fijo y verticales

Cuando el rotor comienza a acelerar, el gradiente de densidad se ajusta a las nuevas fuerzas g que actúan sobre él. En rotores de portatubos oscilantes, el tubo con el gradiente sigue la dirección de la aceleración, y el gradiente no experimenta ninguna redistribución.

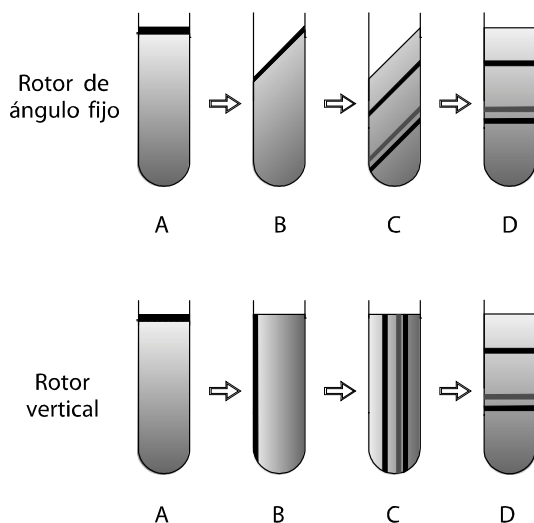


Figura 13.4. Redistribución de la capa de muestra y del gradiente de densidad durante la centrifugación usando rotores de ángulo fijo y rotores verticales. En A, la muestra (con una densidad más baja que la parte superior del gradiente), se coloca como una capa sobre el gradiente, el rotor está detenido. En B, el rotor comienza a acelerar, y la muestra comienza la reorientación. En C, la separación de la muestra comienza. En D el rotor está en reposo, y las bandas de las partículas separadas se orientan respecto a la fuerza gravitacional de la Tierra.

Éste no es el caso con los rotores de ángulo fijo y los rotores verticales, donde el ángulo del tubo es fijo y está dado por el diseño del rotor. Por lo tanto, el gradiente y la muestra se redistribuyen en los tubos, según puede observarse en la Figura 13.4. Este proceso de redistribución ocurre a baja velocidad (0-1000 rpm), por lo que para preservar el gradiente la aceleración debe controlarse cuidadosamente. Una vez que el proceso de reorientación ha culminado, la aceleración a la velocidad final puede proceder sin limitación, y es seguida por una desaceleración lenta antes de recolectar la muestra.

13.6 Diferentes técnicas utilizadas

Es posible clasificar las técnicas de centrifugación como preparatorias (cuando la meta principal es obtener un material purificado) y analíticas (para la caracterización de muestras purificadas). La centrifugación diferencial es un método simple que no requiere la utilización de gradientes de densidad; es una metodología típicamente preparatoria. Técnicas consideradas preparativas pero con algunos usos analíticos son la centrifugación isopícnica y la de velocidad-zonal, ambas requieren la utilización de gradientes de densidad para la separación.

13.6.1 Centrifugación diferencial⁹

La centrifugación diferencial es muy útil para la separación de componentes subcelulares, como organelas y membranas. El material inicial es generalmente un homogenato de tejido o bien un lisado de células. Un procedimiento estándar se observa en la Figura 13.5, donde se separan distintos pellets consecutivos mientras que el sobrenadante se centrifuga a mayores fuerzas g durante tiempos más prolongados.

La Figura 13.6 ilustra la desventaja principal de la centrifugación diferencial. La muestra inicial contiene una mezcla homogénea de diversas partículas. Las partículas más pequeñas (o menos densas), que están cerca al fondo, precipitarán (formando un pellet) junto con partículas grandes (o más densas). La pureza de las fracciones puede ser aumentada resuspendiendo los pellets y sometiendo a una nueva centrifugación; esto generalmente no se hace, ya que la centrifugación diferencial suele ser solamente el primer paso en un protocolo de purificación.

9. D. Rickwood Ed., "Centrifugation-A Practical Approach", IRL Press, Oxford, 1984, pp. 168-189.

XIII. CENTRIFUGACIÓN

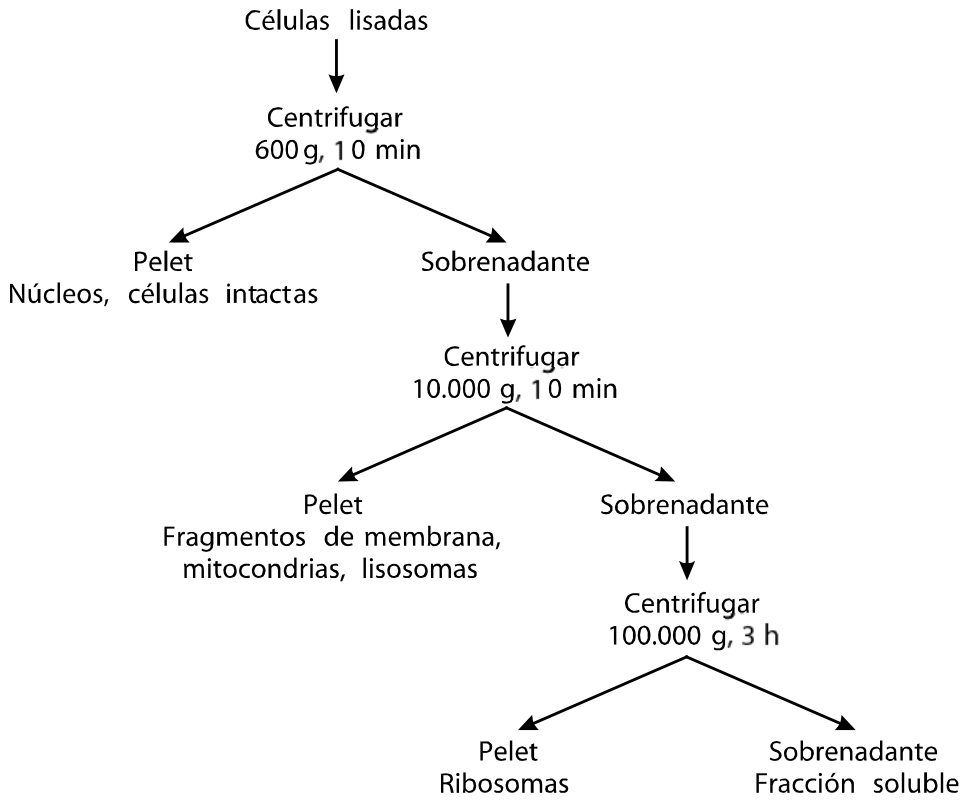


Figura 13.5. Típico protocolo para una centrifugación diferencial. Para obtener fracciones más purificadas, los pellets podrían ser suspendidos nuevamente en solución buffer y centrifugados nuevamente.

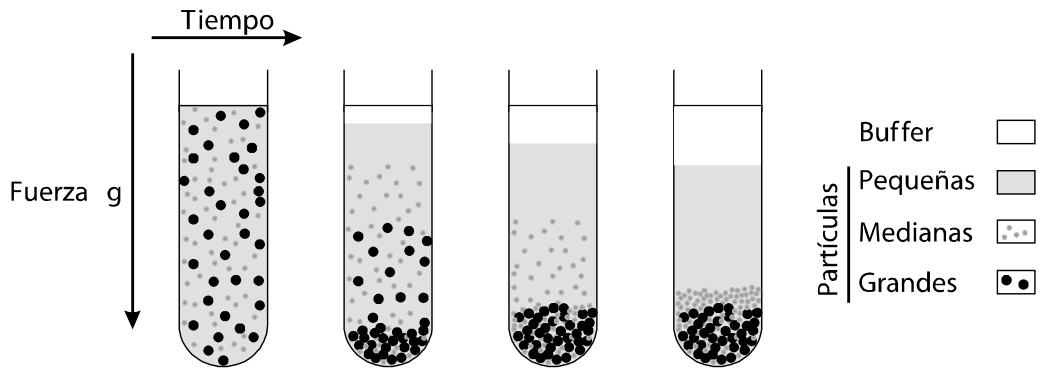


Figura 13.6. Proceso de sedimentación en un sistema de varios componentes (solvente con tres tamaños de partículas). Observe que los pellets contienen una mezcla de partículas.

13.6.2 Centrifugación de velocidad-zonal

En la centrifugación de velocidad-zonal (o de *velocidad de sedimentación*) la muestra se carga como una capa delgada encima de un medio de gradiente de densidad. Durante la centrifugación, la muestra se separa en bandas, en base a sus diversos coeficientes de sedimentación (s). Para las partículas biológicas, el coeficiente s se relaciona principalmente con el tamaño de las partículas. Este proceso se ilustra en la Figura 13.7A.

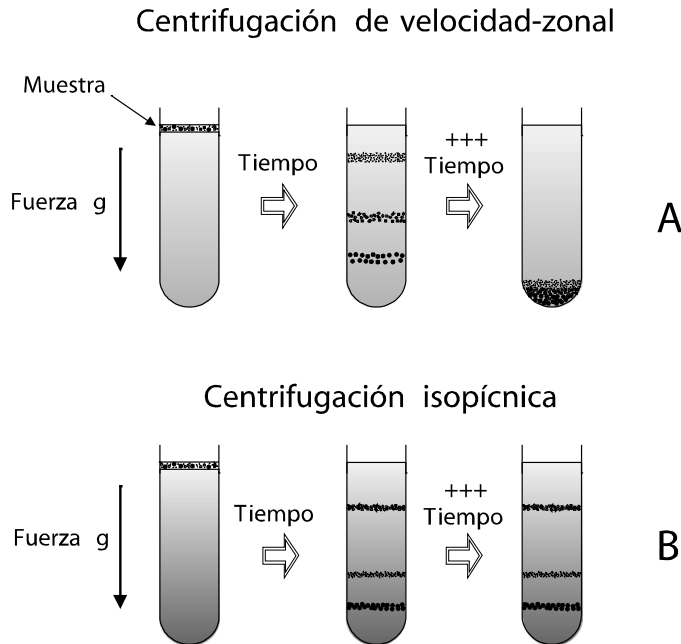


Figura 13.7. Comparación entre la centrifugación por velocidad-zonal e isopícnica. Observe que el gradiente usado en técnicas de velocidad-zonal es bajo, y si la centrifugación continúa, las partículas formarían un pellet en el fondo. La difusión causa que las bandas se ensanchen durante la centrifugación por velocidad-zonal, pero esta no es evidente cuando las partículas “se enfocan” mediante la centrifugación isopícnica.

La densidad máxima del gradiente no excede generalmente la densidad de las partículas. Debido a esto, si la centrifugación continúa indefinidamente, las partículas formarían un pellet en el fondo del tubo. El gradiente se elige con la menor densidad y viscosidad posible, para permitir una separación rápida y reducir al mínimo el ensanchamiento difusional de las bandas.

En la centrifugación de velocidad-zonal las condiciones para las partículas biológicas sensibles son suaves, (presión osmótica baja, fuerza g y viscosidad) y la separación es típicamente más rápida que en las separaciones isopínicas. Las aplicaciones incluyen la separación de proteínas y de nucleoproteínas, como los ribosomas.

13.6.3 Centrifugación isopícnica

En la centrifugación isopícnica (o de *equilibrio de sedimentación*) las partículas se mueven a través de un gradiente de densidad hasta que alcanzan sus puntos isopícnicos. Este es el punto donde la densidad de la solución iguala la densidad de la partícula, momento en el que la partícula detiene su movimiento. Con esta técnica, el tiempo necesario para una separación dada no es crítico. La muestra se separa en bandas, y la separación ocurre en base de la densidad boyante de las partículas. El ensanchamiento difusional no es significativo, y las partículas “se enfocan” en bandas muy estrechas. En esta técnica la muestra se puede cargar en la parte superior del gradiente de densidad, en el fondo, o bien mezclar con una solución formadora de gradiente; las partículas se mueven hasta que llegan sus posiciones de equilibrio.

El método isopícnico se ha utilizado para demostrar dramáticamente la replicación semi-conservadora del DNA, utilizando gradientes de densidad de CsCl. La separación de DNA, RNA, proteína y carbohidratos se puede realizar en soluciones densas de CsCl, donde el RNA forma un pellet, el DNA forma bandas, y las proteínas y los carbohidratos forman una capa delgada (o película) en la parte superior del gradiente.

13.7 Colectando las muestras

Una vez que el proceso de centrifugación ha finalizado, hay dos maneras principales de coleccionar distintas fracciones. Uno de éstos consiste en perforar el fondo del tubo plástico utilizado en la centrifugación (naturalmente descartable), y coleccionar gota a gota las diferentes fracciones; la colección se hace desde las partículas de densidad más alta hacia las de menor densidad. Otra posibilidad es el desplazamiento del gradiente hacia arriba mediante una solución más densa que se inyecta al fondo del tubo; en este caso, las fracciones se coleccionan desde la parte superior del tubo, desde las de menor densidad hasta las de mayor densidad. Cada fracción se puede examinar por separado (por ejemplo, mediante espectrofotometría uv) y los datos obtenidos utilizados para trazar un gráfico de absorbancia versus volumen del efluente o densidad. La instrumentación moderna permite la medida *on-line* durante el proceso de cosecha de la muestra centrifugada.

13.8 Ultracentrifugación analítica

Las técnicas de centrifugación se utilizan principalmente en protocolos de separación y de purificación, o como paso de preparación de muestras en bioquímica analítica. Históricamente, la ultracentrifugación analítica era importante para el cálculo absoluto y de elevada exactitud del peso molecular de materiales y polímeros biológicos. La información

obtenida de experimentos de ultracentrifugación corresponde a analitos en condiciones nativas, mientras que muchas otras técnicas (por ejemplo SDS-PAGE y MS) se aplican a biomoléculas desnaturalizadas o fragmentadas.

La ultracentrifugación analítica se realiza en celdas de bajo volumen (1 mL o menos), con muestras de la más elevada pureza, en una centrífuga especialmente diseñada, equipada con un sistema óptico de detección que permite seguir el proceso de sedimentación continuamente. Además de la determinación del peso molecular, es posible la determinación del tamaño y forma, los coeficientes de sedimentación, densidad y el coeficiente friccional de la biomoléculas. Esta técnica también se ha utilizado para demostrar la replicación semi-conservadora del DNA, los cambios conformacionales que se presentan cuando se forman los complejos enzima-sustrato, y para el estudio de interacciones macromoleculares. Como la mayoría de las técnicas analíticas, las muestras no son generalmente recuperadas después del experimento. Las muestras típicas son proteínas, lipoproteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, partículas subcelulares, células y virus.

13.8.1 Instrumentación

La primera ultracentrifuga analítica fue diseñada por Svedberg en 1923. Desde entonces, las mejoras principales que se han incorporado están referidas a la adquisición y procesamiento de datos, mientras que el diseño del hardware no se ha modificado perceptiblemente. Un instrumento típico se observa en la Figura 13.8; se compone básicamente de una centrífuga de la alta velocidad equipada de un sistema óptico de detección que sea capaz de examinar las características ópticas de la totalidad de la celda que contiene la muestra.

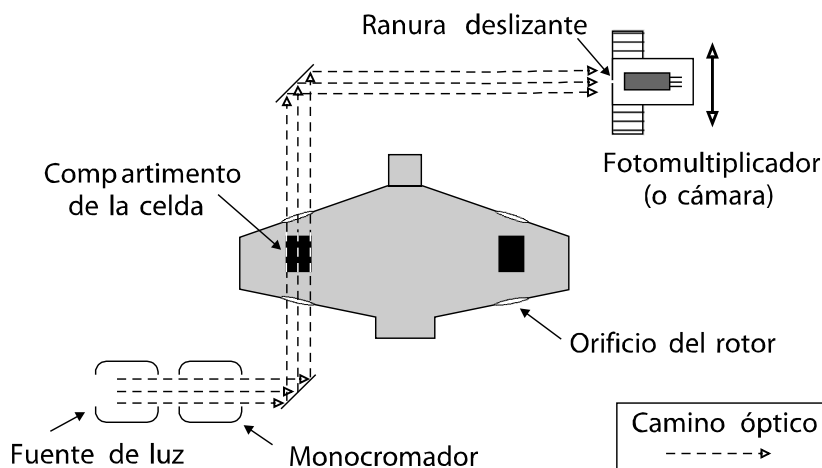


Figura 13.8. Ultracentrifuga analítica equipada de un sistema de detección óptico uv-visible. El sistema de “ranura deslizante” (“sliding slit”) en el fotomultiplicador permite registrar posicionalmente los valores de la absorbancia a lo largo de la celda.

XIII. CENTRIFUGACIÓN

La muestra se vierte en una cavidad de la denominada “pieza central” (centerpiece), formada por un único o doble sector, fabricada de una aleación de aluminio o de una resina epoxy (Figura 13.9B). A la pieza central se le ajustan ventanas transparentes hechas de cuarzo o de zafiro, este último material se utiliza cuando se requieren muy elevadas fuerzas g . Una cubierta de la celda (que incluye varias partes, como espaciadores, juntas y otros) que contiene el montaje de la celda se coloca en el rotor de la ultracentrifuga. Una representación simplificada del ensamblado se muestra en la Figura 13.9A. Las celdas de sector doble permiten que una celda de referencia sea centrifugada simultáneamente, de tal manera de que los valores de absorbancia de la referencia puedan ser restados del de la muestra, para calcular concentraciones. Descripciones más detalladas de las celdas sectoriales y la instrumentación analítica utilizada en ultracentrifugación se pueden encontrar en Lavrenko *et al.*¹⁰

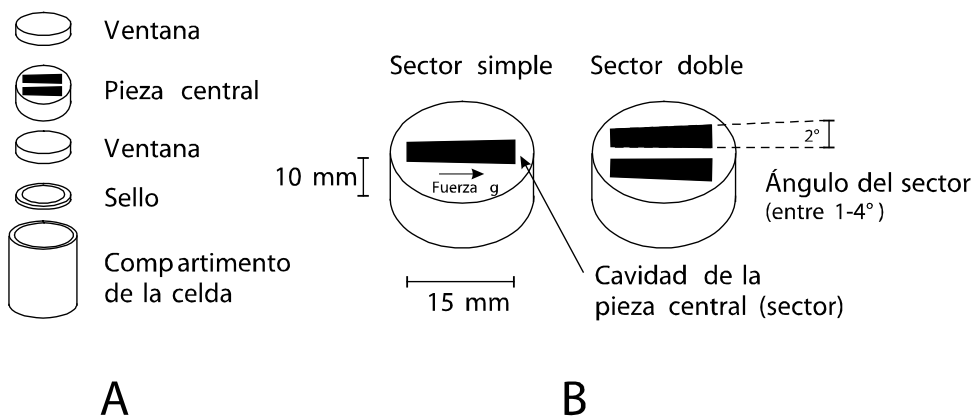


Figura 13.9. Componentes básicos de las celdas analíticas típicas utilizadas en ultracentrifugación. El ángulo del sector es el ángulo respecto al centro de rotación.

La orientación horizontal del compartimento de la muestra permite la detección posicional del analito con el sistema óptico. Las líneas de fuerza en estas celdas sectoriales son radiales (Figura 13.10), y paralelo a las paredes de celda, para evitar los efectos de convección y el denominado “efecto pared”.

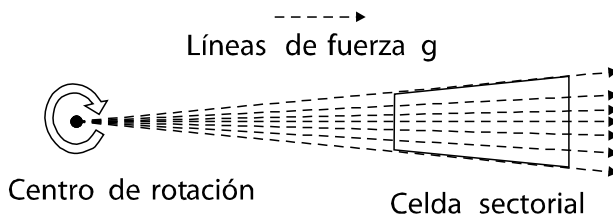


Figura 13.10. Líneas de fuerza en una celda sectorial.

10. Hsien-Wen Hsu, “*Separation by Centrifugal Phenomena*”, “*Techniques of Chemistry Vol. XVI*”, John Wiley & Sons, New York, 1981. pp 220-228.

Otras técnicas ópticas han sido utilizadas para indagar los experimentos de ultracentrifugación analítica. Éstas incluyeron el índice de refracción (utilizando óptica de Schlieren), así como los patrones de interferencia producidos usando ópticas de Rayleigh o de Lebedev.¹¹ En ambos casos, los datos se adquieren usando un equipo de registro fotográfico o de video. Ejemplos de los datos obtenidos con estos diversos sistemas ópticos se muestran en la Figura 13.11.

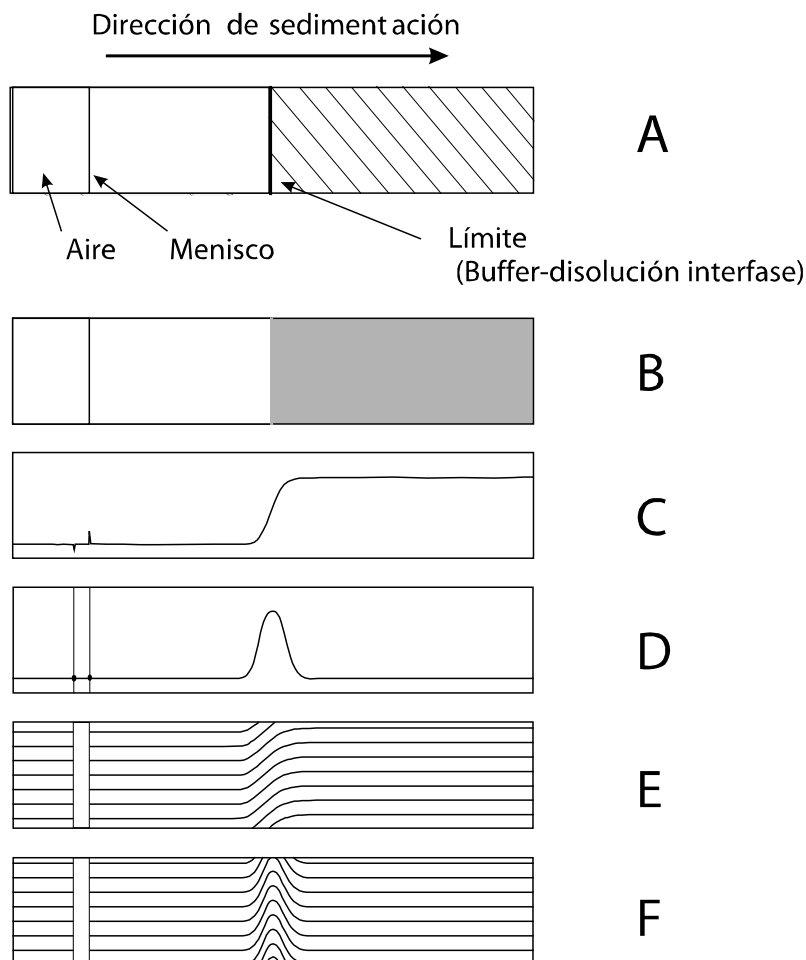


Figura 13.11. Resultados para un experimento de ultracentrifugación de límite móvil usando diversos sistemas ópticos de detección y una celda de sector doble. A es una representación gráfica, B es el resultado de una fotografía utilizando radiación ultravioleta, C es un diagrama de la absorbancia respecto a la distancia (obtenido a partir de B), D es una fotografía obtenida utilizando la óptica de Schlieren, E es un diagrama de interferencia obtenido usando la óptica de Rayleigh, y F es otro diagrama de interferencia, obtenido con la óptica de Lebedev.

11. P. Lavrenko, V. Lavrenko y V. Tsvetkov, en "Analytical Ultracentrifugation V", H. Cölfen Vol. Ed., "Progress in Colloid and Polymer Science", F. Kremer and G. Lagaly Eds., vol 113, 1999, pp.14-22.

Las fuentes de luz usadas comúnmente son las lámparas de arco del mercurio de alta energía (100 W) o fuentes láser; la alta energía es necesaria debido a la corta duración de la exposición de la celda de la centrífuga a la trayectoria de la luz. En un rotor típico, la luz pasa a través de la celda cerca de unos 7 ms cada segundo, durante el resto del tiempo la luz impacta sobre el rotor.¹² Es necesaria la utilización de ópticas de alta calidad para conducir la luz desde la fuente al detector.

13.8.2 Análisis de velocidad de sedimentación

En esta técnica la partícula se mueve hacia una posición del equilibrio, pero el experimento es terminado antes de que el equilibrio sea alcanzado. El cambio en la velocidad de la partícula se interpreta usando ecuaciones cinéticas. Considere un sistema simple de dos componentes, como una proteína disuelta en solución tampón (por ejemplo 1 mg/mL BSA en solución tampón de fosfatos 0,1 M). En una celda sectorial, es posible seguir el movimiento de la zona límite mediante técnicas ópticas (Figura 13.11). Esta técnica también se llama “análisis del límite móvil”, y se utiliza para determinar el coeficiente de sedimentación s , definido como:

$$s = \frac{dr/dt}{\omega^2 r} = \frac{d \ln r}{dt} \times \frac{1}{\omega^2}, \quad [13.11]$$

donde ω es la velocidad angular en radianes/sec y r es la distancia del límite respecto al centro de rotación, en centímetros. Es posible integrar r en la Eq. 13.11 con respecto al tiempo (entre t_1 y t_2), para obtener la Eq. 13.12, donde el tiempo está en segundos, y r en cm:¹³

$$s = \frac{2,1 \times 10^2 \log_{10}(r_2/r_1)}{(\text{rpm})^2 (t_2 - t_1)}. \quad [13.12]$$

Un diagrama del $\ln r$ versus t (Eq. 13.11) o dos medidas de la posición del límite (Eq. 13.12) pueden ser utilizadas para determinar el valor de s . El coeficiente de sedimentación se expresa generalmente en las unidades de Svedberg, donde 1 S = 10^{-13} segundos.

El valor de s se puede utilizar para calcular el peso molecular de una macromolécula, usando la Ecuación 13.13:

12. R. Gauglitz en “Analytical Ultracentrifugation”, J. Behlke Guest Ed., “Progress in Colloid and Polymer Science”, F. Kremer y G. Lagaly Eds., V. 99, 1995, pp.199-208.

$$s = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{Nf} \quad [13.13]$$

donde M es el peso molecular, \bar{v} es el volumen específico parcial, ρ es la densidad del solvente, N es número de Avogadro y f es el coeficiente friccional de la partícula. El valor de f se puede calcular con el coeficiente de difusión (D):

$$D = \frac{RT}{Nf} \quad [13.14]$$

Substituyendo la Eq. 13.14 en la Eq. 13.13 podemos obtener la ecuación de Svedberg:

$$M = \frac{sRT}{D(1 - \bar{v}\rho)} \quad [13.15]$$

El coeficiente de difusión indica el grado de ensanchamiento del límite durante el experimento, pero no es fácil de determinar, lo que limita el uso de este método.

Para utilizar la Eq. 13.15 para obtener pesos moleculares, los valores de s y D obtenidos experimentalmente deben ser corregidos a las condiciones ideales. El s observado y los valores de D son dependientes de las características de la solución solvente utilizada, así como de la temperatura. Es posible convertir un valor observado de s a un valor estándar para una solución con la densidad y la viscosidad del agua a 20°C usando la siguiente ecuación:¹³

$$s_{20,w} = (s_{T,m}) \frac{\eta_{T,m} (\rho_p - \rho_{20,w})}{\eta_{T,m} (\rho_p - \rho_{T,m})} \quad [13.16]$$

donde $s_{T,m}$ es el coeficiente de sedimentación determinado experimentalmente usando el medio m y la temperatura T , $\eta_{T,m}$ y $\eta_{20,w}$ son la viscosidad del medio a T y la viscosidad del agua a 20°C respectivamente, ρ_p es la densidad de la partícula en estudio, y $\rho_{T,m}$ y $\rho_{20,w}$ son la densidad del medio a T y la densidad del agua a 20°C respectivamente. El coeficiente de sedimentación se ha calculado para una variedad de partículas biológicas, y la Figura 13.12 muestra algunos ejemplos de estos valores.

13. P. Sheeler, "Centrifugation in Biology and Medical Science". John Wiley & Sons, New York, 1981, pp 23-25.

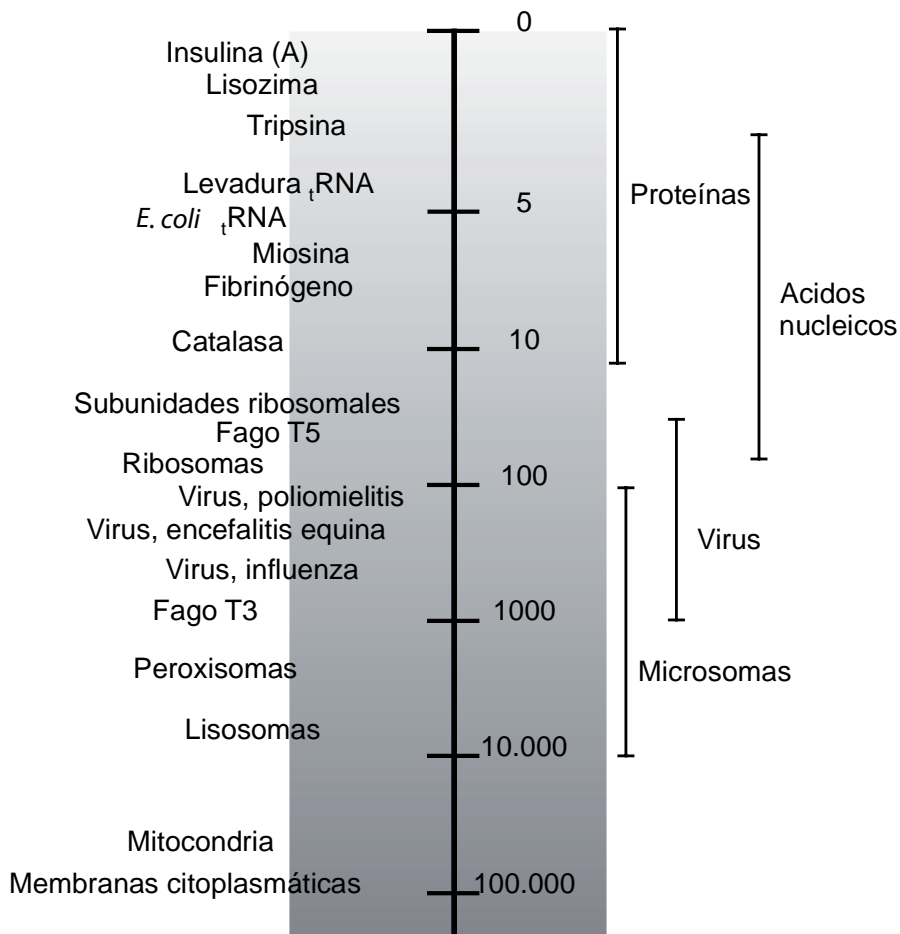
Coeficiente de sedimentación ($s_{20,w}$) en unidades Svedberg

Figura 13.12. Coeficientes de sedimentación (s) para algunas partículas biológicas, con los valores expresados en unidades Svedberg. Las partículas nucleares tienen valores en el orden de 10^6 - 10^7 S, mientras que las células enteras tienen valores de entre 10^7 - 10^8 unidades Svedberg.

La concentración de la muestra afecta los valores observados de s ; por ejemplo, cuando la concentración de una proteína aumenta, se observan valores más bajos de s . Un número de experimentos con diversas concentraciones de la proteína son necesarios corregir esta desviación dependiente de la concentración, para permitir la extrapolación del valor de s a una concentración de la proteína igual a cero. Este nuevo valor extrapolado a la concentración cero se conoce como $s_{20,w}^0$ y se utiliza en el cálculo del MW (M) utilizando la Eq. 13.15. Pero si se sabe que la proteína o la macromolécula tiene una forma globular simple, en vez de calcular D es posible utilizar la siguiente fórmula empírica:

$$s_{20,w}^0 = 0,00248 M^{0,67} . \quad [13.17]$$

Otras fórmulas empíricas han sido propuestas para diversos materiales biológicos, incluyendo DNA de cadena simple, cadena doble y circular.¹⁴

13.8.3 Análisis de equilibrio de sedimentación

En este tipo de experimento, las partículas son aceleradas por fuerzas g hasta que alcanzan sus posiciones del equilibrio. Esto significa que la sedimentación procede hasta que las fuerzas de sedimentación son balanceadas por la difusión. Hay varios acercamientos a esta técnica. Uno de éstos es escanear la celda, para obtener el perfil de la absorbancia a varios tiempos y distancias; esto permite el cálculo de la concentración en función de distancia al eje de rotación (dc/dr). La expresión siguiente puede entonces ser utilizada para calcular la masa de la partícula:

$$M = \frac{RT}{(1 - \nu\rho)\omega^2} \frac{1}{rc} \frac{dc}{dr} . \quad [13.18]$$

Es posible utilizar esta técnica para estudiar sistemas más complejos, incluyendo muestras polidispersas en las que las interacciones ocurren entre los distintos componentes. Los detalles referidos a los métodos matemáticos empleados se pueden consultar en Schachman.¹⁵

13.9 Ejemplos seleccionados

13.9.1 Centrifugación analítica para la determinación de estructuras cuaternarias¹⁶

La ultracentrifugación analítica ha sido empleada para estudiar la serina acetiltransferasa (SAT) de *E. coli*, para determinar cuántas subunidades de la proteína están presentes en la enzima funcional. En bacterias, la L-serina se convierte en cisteína en un proceso de dos

14. B.D. Young en "Centrifugation-A Practical Approach", D. Rickwood Ed., IRL Press, Oxford, 1984, pp. 133.

15. H.K. Schachman, "Ultracentrifugation in Biochemistry". Academic Press, New York, 1959, pp. 201-247.

16. V.J. Hindson, P.C.E. Moody, A.J. Rowe y W.V. Shaw, *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 2000, 461-466.

etapas; SAT cataliza la primera reacción en este camino metabólico, denominado de “fijación del sulfuro”. La subunidad SAT ha sido secuenciada, siendo su MW de 29,3 kD.

Los experimentos de equilibrio de sedimentación fueron realizados, utilizando tres concentraciones de SAT, (0,096, 0,73 y 3,54 mg/mL) en solución tampón, a 8000 RPM y 5°C, hasta que la concentración de la proteína versus la distancia radial alcanzó el equilibrio, típicamente antes de las 24 h. La celda fue escaneada cada 3 h a 280 nm, y los valores de absorbancia fueron utilizados para calcular los perfiles de concentración. Los análisis de las distribuciones del soluto en equilibrio (SAT) fueron realizados utilizando los programas de computadora proporcionados por los fabricantes de la ultracentrífuga. Los resultados obtenidos para tres concentraciones de la proteína y para una proteína trimérica utilizada como control, la del cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), en la que cada monómero tiene MW = 24.965 se muestran en la Tabla 13.1. Estos datos han sido corregidos por los efectos de concentración utilizando la siguiente Ecuación,¹⁷

$$s = \frac{s^o}{(1 + k_s c)}, \quad [13.19]$$

donde k_s es un coeficiente dependiente de la concentración y c es la concentración corregida por dilución radial, revela que la proteína SAT es hexamérica. Por otra parte, el bajo grado de correlación entre la concentración y el MW experimentalmente determinado de la holoenzima es consistente con un pequeño grado de autoasociación.

Enzima	Concentración [mg/mL]	MW enzima	MW subunidad	Estructura cuaternaria aparente
SAT	0,10	169.700 ± 1060	29.260	5,8
SAT	0,73	177.600 ± 1060	29.260	6,1
SAT	3,60	184.300 ± 1060	29.260	6,3
CAT	0,50	75.100 ± 740	24.965	3,0

Tabla 13.1. Pesos moleculares calculados a partir de experimentos de sedimentación de equilibrio. La proteína CAT, utilizada como una proteína control, permite demostrar la confiabilidad de los datos. Reproducido, con permiso, de V.J. Hindson, P.C.E. Moody, A.J. Rowe y W.V. Shaw, *The Journal of Biological Chemistry* **275**, No 1, 2000, 461-466. “Serine Acetyltransferase from *Escherichia coli* is a Dimer of Trimers”. © 2000 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

17. H.K. Schachman, “*Ultracentrifugation in Biochemistry*”. Academic Press, New York, 1959, pp. 91.

Experimentos adicionales de sedimentación de velocidad fueron realizados utilizando tres concentraciones de SAT, a velocidad más alta (40.000 RPM), donde las demás condiciones experimentales fueron similares. La celda fue escaneada cada 30 minutos a 280 nm durante 14 h. Los datos obtenidos a cada concentración de la proteína indican que no existe auto-asociación de las moléculas proteicas. El coeficiente de sedimentación ($s_{20,w}^0$) fue calculado, siendo su valor de $7,08 \pm 0,09$ S y a partir de este el coeficiente friccional de SAT se estimó en 1,53; este valor es alto en comparación con el valor previsto para una proteína globular (cerca de 1,15), apoyando la hipótesis que postula que las subunidades de SAT no se organizan en forma compacta. Esta hipótesis fue confirmada usando otras técnicas. Los autores concluyen que el bloque de construcción fundamental es probablemente un trímero, donde SAT estaría compuesta probablemente por dos trímeros unidos en forma laxa.

13.9.2 Separación de retrovirus en gradientes auto-generados¹⁸

Los retrovirus son virus donde el material genético es RNA. Varios retrovirus se relacionan con enfermedades humanas, como la gripe o el HIV. Algunos retrovirus humanos tienen glicoproteínas como estructuras superficiales importantes; éstas son generalmente de importancia crucial en los procesos de reconocimiento celular, procesos infecciosos y virulencia, y por lo tanto para su caracterización

Células humanas de pacientes sufriendo de esclerosis múltiple fueron cultivadas, y el sobrenadante fue separado de las células y restos del cultivo por centrifugación a 1000 g y 4°C por 30 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo de centrifuga de 60 mL, y luego unos 4 mL de una solución concentrada del iodixanol se colocó en el fondo del tubo; este es un medio yodado no iónico formador de gradiente de densidad, en HEPES-NaOH (60 mM, pH 7,4, 0,8% NaCl). Este medio denso colocado en el fondo del tubo se lo suele denominar “almohadón” (“cushion”), y previene el pelleteado de las partículas menos densas que él. Las partículas entonces se concentran en la interfaz entre el sobrenadante y el almohadón. Los tubos fueron centrifugados en un rotor de ángulo fijo (22,5°) a 45.000 g (4°C, 2 h), al finalizar el proceso el sobrenadante se retira del tubo por aspiración, dejando solamente unos 4-5 mL en la proximidad del almohadón. El almohadón junto con el sobrenadante que quedó en el tubo son mezclados, y su volumen medido para poder ajustar la concentración final del medio generador de gradiente.

Esta mezcla, ajustada para contener 20% de iodixanol, fue transferida a tubos de 11 mL y centrifugada en un rotor vertical a 364.000 g (4°C, 3,5 h). Bajo estas condiciones, un gradiente con una densidad desde 1,02 hasta 1,25 fue formado. Después de la centrifugación,

18. A. Møller-Larsen, T. Christensen, *Journal of Virological Methods* **73**, 1998, 151-161.

el gradiente fue recogido por punción del fondo del tubo, en fracciones de 0,5 mL. Cada fracción fue ensayada por PCR para detectar la concentración del retrovirus.

Los autores demostraron que el medio de gradiente de iodixanol es mejor para este propósito que el medio utilizado previamente, donde la sustancia generadora de gradiente fue sacarosa. Los gradientes formados por sacarosa tienen alta viscosidad y osmolaridad en comparación con los gradientes formados por compuestos yodados; estas características pueden alterar las propiedades externas (glicoproteínas) de este virus, reduciendo su virulencia; por otra parte, la separación en condiciones suaves en medios del iodixanol permite la concentración de cantidades pequeñas de virus en comparación con los gradientes de sacarosa.

13.9.3 Separación de lipoproteínas de plasma humano

Las lipoproteínas transportan lípidos en la sangre; tempranamente se estableció un sistema de clasificación usando métodos de centrifugación, basado en la densidad de estos transportadores. Las lipoproteínas se clasifican como quilomicrones, los de mayor tamaño y de menor densidad ($\rho < 0,96$ g/mL), con baja concentración de proteína (2%). Las lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL), las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son progresivamente más pequeñas, más densas y ricas en proteína, con un aumento de la ρ y contenido proteínico hasta 1,210 g/mL y 40-55% para HDL.

La Figura 13.1 muestra las fuerzas que actúan durante la centrifugación. Si la ρ de la partícula es más baja que la del medio de la centrifugación, la fuerza boyante se convierte en importante y la partícula se moverá hacia arriba. Técnicas en las cuales las partículas a ser analizadas o separadas se mueven hacia arriba, alcanzando la superficie del medio de la centrifugación, suelen ser llamadas separaciones por flotación.

Los procedimientos estándares de centrifugación usados para el fraccionamiento de lipoproteínas en plasma de sangre humana se realizan por *flotación secuencial* usando KBr, NaBr, NaCl o una combinación de estas sales para producir una solución de determinada densidad, en la que una fracción determinada de lipoproteína se mueve hacia arriba

En un procedimiento típico, el plasma humano se centrifuga (generalmente en un rotor de ángulo fijo) a 50.000 g por 30 minutos; en estas condiciones, los quilomicrones flotan como capa lechosa. Una vez retirado el sobrenadante, el resto de la disolución se centrifuga a 100.000 g por 20 horas, obteniéndose una capa flotante de VLDL, así como un precipitado (pellet), que contiene las proteínas del plasma, así como las fracciones de lipoproteína LDL y HDL. El pellet se resuspende y mezcla con una solución salina concentrada, para obtener una densidad final de 1,063 g/mL, y se centrifuga a 100.000 g por 28 h. Una capa flotante de LDL se obtiene, y un pellet que se resuspende y ajusta

a una densidad de 1,21 g/mL. La centrifugación a 100.000 g por 48 h produce una capa flotante de HDL.

Usando gradientes autoformados de iodixanol, se ha descrito recientemente un método rápido para la separación de las lipoproteínas presente en el plasma.¹⁹ El tiempo de centrifugación se reduce a aproximadamente 4 h, pero el gradiente se debe recoger cuidadosamente, en fracciones de 0,1-0,2 mL.

13.10 Lecturas sugeridas

P. Sheeler, “*Centrifugation in Biology and Medical Science*”. John Wiley & Sons, New York, 1981.

D. Rickwood Ed., “*Centrifugation-A Practical Approach*”, IRL Press, Oxford, 1984.

J. Graham. “*Biological Centrifugation*”, BIOS Scientific Publishers Limited, 2001.

13.11 Problemas

1.(a) Calcule de RCF máxima (RCF_{\max}), mínima (RCF_{\min}) y promedio (RCF_{av}), para un tubo de centrifuga, donde el menisco se encuentra a 12 cm desde el eje de rotación y el fondo a 22 cm. El rotor gira a 27.000 rpm.

(b) ¿Si el rotor girara a la mitad de la velocidad (13.500 rpm), la fuerza g aplicada a la solución será aproximadamente la mitad?

2. (a) Un rotor de titanio de ángulo fijo puede ser utilizado a una velocidad máxima de 52.000 rpm. Este rotor tiene un $r_{\max}=10,8$ cm y un $r_{\min}=3,2$ cm. Calcule el valor de k (clarificación).

(b) Compare el valor obtenido con los presentados en la Tabla 13.2. Elija el mejor rotor para la separación de proteínas solubles provenientes de un homogenato de células de mamífero.

19. J.M. Graham, J.A. Higgins, T. Gillott, T. Taylor, J. Wilkinson, T. Ford y D. Billington, *Atherosclerosis* **124**, 1996, 125-135.

Tipo de rotor	RCF _{max} (g)	RCF _{min} (g)	Capacidad total (mL)	<i>k</i>
Oscilante	90.300	39.300	102	338
Oscilante	285.000	119.000	84	137
Oscilante	484.200	254.000	26,4	45
Angulo fijo (18°)	59.200	29.600	940	398
Angulo fijo (14°)	94.500	63.300	210	113
Angulo fijo (29°)	511.000	220.800	112	38
Vertical	70.000	50.400	312	123
Vertical	240.600	173.400	280	34
Vertical	510.000	416.600	40,8	8

Tabla 13.2. Valores de *k* y de capacidad total para rotores de ultravelocidad. Los rotores denominados de supervelocidad pueden aplicar RCF de entre 5000 y 50.000 g, con valores de *k* de entre 400-5000 o aún mayores.

3. Una hoja de datos de un rotor vertical especifica que $k = 304$. Los tubos para este rotor tienen un diámetro interno de 2,4 centímetros, con un $r_{\min} = 13,6$ centímetros. ¿Cuál es la velocidad máxima para este rotor? (Note que en situaciones que involucran rotores reales, al envejecer del rotor se acumula tensión (fatiga) sobre la estructura del rotor, por lo que la velocidad máxima permitida para la utilización segura del rotor disminuye gradualmente).

4. Si el factor *k* es 300 para un rotor oscilante de aleación de aluminio, con $r_{\max} = 19,5$ cm y $r_{\min} = 8$ cm, calcule k_{actual} para velocidades de 10.000, 20.000, 30.000 y 40.000 rpm. La máxima velocidad para este rotor es de 50.000 rpm.

5. ¿Cuánto tiempo es necesario para “pelletar” las partículas del virus de la gripe ($s_{20^{\circ}\text{w}} = 700$) en un rotor con $k = 180$? ¿Cuál es el tiempo necesario para pelletar subunidades ribosómicas de células eucarióticas ($s_{20^{\circ}\text{w}} = 40$ y 60) para las subunidades pequeñas y grandes respectivamente? Asuma que la viscosidad y la densidad del medio son similares a las del agua a 20°C.

6. Una proteína aumenta su distancia al eje de rotación desde 7,6 cm a 9,8 centímetros durante un experimento de 4 h, en el que la velocidad del rotor fue de 40.000 RPM. Calcule el coeficiente de sedimentación para la proteína en unidades Svedberg.

CAPÍTULO 14

CROMATOGRAFÍA DE BIOMOLÉCULAS

14.1 Introducción

Los métodos cromatográficos se utilizan para la separación de los componentes de una mezcla presente en una *fase móvil* (también llamada “carrier”), y se basa en las diversas fuerzas de las interacciones de los componentes en la mezcla con una *fase estacionaria*, que permanece inmóvil. Una interacción más fuerte con la fase estacionaria da lugar a tiempos de retención más largos; este tiempo es el transcurrido entre la introducción de la muestra y el de elución del componente. Este Capítulo se refiere a la cromatografía líquida, donde la fase móvil es generalmente una solución acuosa, y la fase estacionaria son partículas sólidas o bien partículas de un gel semisólido. Los mecanismos de separación que serán tratados incluyen la exclusión molecular (filtración de gel), la cromatografía de intercambio iónico y la de afinidad. Todos estos métodos son aplicables a las macromoléculas biológicas presentes en soluciones acuosas, permiten la separación bajo condiciones suaves y se pueden utilizar a escala preparatoria o analítica.

La cromatografía líquida en columna (LC) habitualmente emplea una columna vertical empacada con una mezcla de las partículas que componen la fase estacionaria. Las partículas se dejan precipitar para que formen una fase densamente empacada y homogénea, luego se elimina el exceso de fase móvil. La muestra se introduce en la parte superior de la columna, seguida por el agregado de fase móvil (eluyente) sin ningún agregado; esta fase móvil se mueve por gravedad a través de la columna, por el retiro continuo de la fase móvil por una salida pequeña en el fondo de la columna. Las adaptaciones modernas de este método incluyen la adición de una bomba post-columna o el uso de presiones suaves en el extremo superior de la columna con el objeto de acelerar la elución de los componentes.

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) emplea partículas muy finas, y utiliza bombas que impulsan la fase móvil a alta presión, para forzarla a través de la columna. La fase móvil pasa desde un depósito a través de la bomba, una válvula inyectora, la columna y un detector en flujo (flow-through detector) hasta un depósito donde se colecta la fase móvil más las muestras, para su posterior disposición final. La válvula inyectora permite la introducción de las mezclas de la muestra en la fase móvil sin ocasionar disturbios o variaciones en el flujo de la fase móvil.

14.2 Unidades y definiciones

Las velocidades de flujo (caudales) se pueden expresar en unidades lineales o de volumen. La velocidad de flujo lineal se refiere a la longitud de la columna recorrida por la fase móvil por unidad de tiempo, y se expresan generalmente en cm/min. Los caudales en unidades de volumen se utilizan comúnmente, y se expresan en mL/min. El tiempo entre la introducción de la muestra y el de elución de uno de sus componentes es el tiempo de retención de ese componente, y se simboliza t_r . El tiempo de retención ajustado, t_r' considera el tiempo requerido para un soluto que no sufre retención o interacciones en la columna, desde la válvula inyectora hasta el detector:

$$t_r' = t_r - t_m \quad [14.1]$$

donde t_m es el tiempo requerido para el soluto que no es retenido para alcanzar el detector. El soluto no retenido tiene $t_r = t_m$, y tiene así $t_r' = 0$. La retención relativa de dos componentes, 1 y 2, se llama α y se define abajo:

$$\alpha = t_{r2}'/t_{r1}' \quad [14.2]$$

donde $t_{r2}' > t_{r1}'$, de modo que los valores sean siempre mayores que la unidad. Dadas ciertas condiciones experimentales, un componente individual tiene un factor de capacidad característico, k :

$$k = (t_r - t_m)/t_m = t_r'/t_m \quad [14.3]$$

Un valor grande de k para un componente dado significa generalmente que se producirá una buena separación; sin embargo, valores grandes de k también implican tiempos largos de elución. Valores de k de entre 2 y 20 generalmente son considerados útiles. El factor de capacidad se relaciona con el coeficiente de partición (denominado también constante de distribución o coeficiente de distribución), K , del soluto (S) entre la fase móvil y estacionaria, donde $K = [S]_{\text{estacionaria}}/[S]_{\text{móvil}}$, y a los volúmenes relativos de la fase móvil e inmóvil en el equilibrio, V_s y V_m , de acuerdo a la Ecuación 14.4:

$$k = K(V_s/V_m) \quad [14.4]$$

La retención relativa de dos componentes, α , se puede expresar también en términos de K :

$$\alpha = t_{r2}'/t_{r1}' = k_2/k_1 = K_2/K_1. \quad [14.5]$$

Varias teorías han sido propuestas para explicar el fenómeno cromatográfico, se describen a continuación algunas de ellas.

14.3 Teoría de los platos teóricos¹

Considere una columna que es dividida en N segmentos de igual longitud, y que cada segmento es justo suficientemente largo para permitir que se alcance el equilibrio completo en la partición del soluto entre la fase inmóvil y la fase móvil, según su coeficiente de partición. Cada uno de estos segmentos se llama un *plato teórico*, y una columna de longitud L tendrá una altura equivalente de plato teórico (HETP) dada por L/N . Una “buena” columna tendrá valores grandes de N ($10^4 - >10^5$), y un HETP pequeño. Se ha demostrado que las columnas empacadas con una fase estacionaria formada por partículas pequeñas poseen valores más altos de N que aquellas empacadas con partículas más grandes.

Los platos teóricos son determinados experimentalmente para un dado soluto, midiendo el tiempo de retención y la anchura máxima en la base de los picos obtenidos:

$$N = (t_r/\sigma)^2 = 16(t_r/w)^2 \quad [14.6]$$

donde σ es la desviación estándar del perfil de elución del soluto (gaussiano), y $w (= 4\sigma)$ es la anchura del perfil de elución medido en la base del pico, el que puede ser medido fácilmente por triangulación. En la práctica, los valores de N se determinan periódicamente para un soluto representativo, de tal manera de comprobar el funcionamiento de la columna y detectar degradación de la fase estacionaria u otros problemas.

La teoría de los platos teóricos asume que el equilibrio completo ocurre en cada uno de los N segmentos de la columna. Esta consideración no es aplicable a todos los solutos, y debido a esto, la teoría cinética fue desarrollada.

14.4 Teoría cinética²

La teoría cinética considera la velocidad finita a la cual el soluto puede equilibrarse entre la fase móvil y la estacionaria. La forma de las bandas que son precedidas por la teoría cinética dependen de la velocidad de elución, de la difusión del soluto a lo largo de la longitud

1. N.A. Parris, “*Instrumental Liquid Chromatography*”, Elsevier, New York, 1976. Capítulo 2, pp. 7-18.
2. S.J. Hawkes, *J. Chem. Educ.* **60**, 1983, 393-398.

de la columna, y de la disponibilidad de diversas trayectorias para puedan ser seguidas por las moléculas del soluto. El valor del HETP ahora depende de v , la velocidad de flujo de la fase móvil, según la ecuación de van Deemter, Eq. 14:

$$\text{HETP} = A + B/v + Cv \quad [14.7]$$

donde A, B y C son constantes para un dado sistema de columna/fase móvil/soluto. La ecuación de van Deemter implica que el HETP no solamente varía con el caudal, sino que también pasa por un mínimo a un valor óptimo de velocidad de flujo.

Cada uno de los términos en Eq. 14.7 se pueden asociar conceptualmente a diversos fenómenos presentes durante una separación cromatográfica. El primer término, A, resulta de las diversas trayectorias alrededor de las cuales las moléculas del soluto en la fase móvil pueden viajar a través de las partículas de la fase estacionaria; su valor es independiente del caudal, y partículas más pequeñas rinden valores más pequeños de A y por lo tanto valores más pequeños de HETP. El segundo término, B/v , se origina en la difusión longitudinal, como resultado del perfil del flujo, como se muestra en la Figura 14.1:

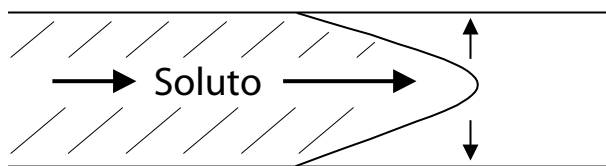
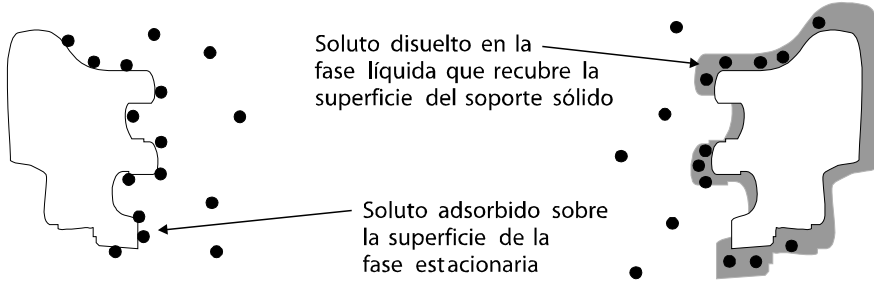


Figura 14.1. Perfil de flujo para un soluto inyectado que viaja a través de una fase estacionaria empacada.

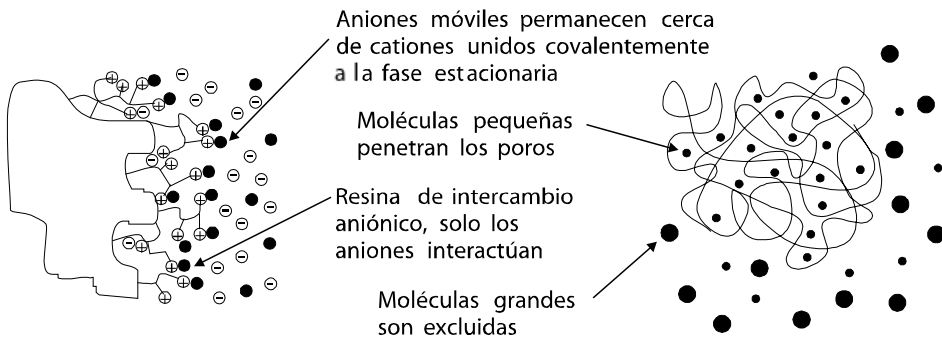
El flujo más rápido del soluto ocurre en el centro de la columna; a medida que nos alejamos hacia las paredes de la columna el flujo es más lento, y se acerca a cero en la capa de líquido que entra en contacto con las paredes. Por lo tanto, el soluto en el centro de la columna (en el frente de la zona del soluto) está presente en una concentración más alta que el soluto cerca de las paredes de la columna. Debido a este gradiente de concentración, el soluto difunde hacia las paredes, y disminuye su velocidad, retrasándose. El resultado es que la muestra inyectada desarrolla límites más difusos a medida que viaja por la columna. El término final en Eq. 14.7, Cv , resulta del tiempo finito que se requiere para el equilibrio del soluto entre la fase móvil y estacionaria. Si la zona del soluto se mueve rápidamente pero el soluto no puede escapar la fase estacionaria rápidamente, entonces el soluto presente en la fase móvil se mueve hacia delante, originando ensanchamiento de las bandas.

En una columna eficiente, los valores de A, B, y C son todos pequeños, dando por resultado un pequeño valor de HETP (10^{-4} o inclusive $<10^{-5}$ metros). Se ha encontrado que las mejores eficiencias se obtienen cuando las partículas de la fase estacionaria son muy pequeñas, del orden de los 3-10 μm .



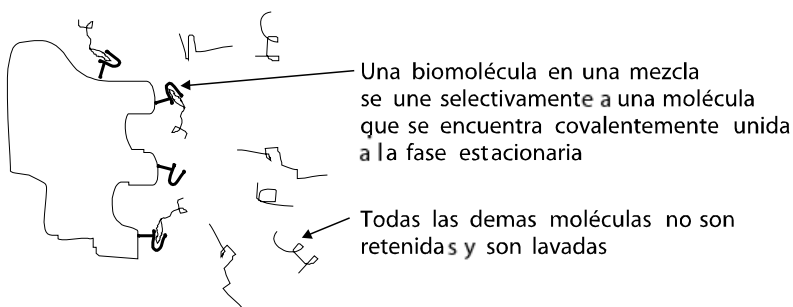
Cromatografía de adsorción

Cromatografía de partición



Cromatografía de intercambio iónico

Cromatografía de exclusión



Cromatografía de afinidad

Figura 14.2. Mecanismos de retención para las cinco clases principales de cromatografía.

La resolución de dos componentes se puede cuantificar usando la Eq. 14.8:

$$\begin{aligned} \text{Resolución} &= \Delta t_r / w_{av} \\ &= \frac{\text{Diferencia en tiempos de retención}}{\text{Promedio del ancho de la base de los picos}} \end{aligned} \quad [14.8]$$

Se ha demostrado que los valores de resolución aumentan con la raíz cuadrada de la longitud de la columna. Así, al duplicar la longitud de una columna aumentará la resolución en un factor de $(2)^{1/2}$.

La Figura 14.2 muestra las cinco clases principales de cromatografía que se utilizan comúnmente. Cada una se basa en un único mecanismo de retención, y tres de estos mecanismos son de interés particular para la separación y la cuantificación de macromoléculas biológicas. La cromatografía de exclusión molecular también llamada filtración de gel, separa especies basándose en el tamaño molecular, siendo las moléculas pequeñas retenidas en la columna y las especies grandes eluyendo en primer lugar. La cromatografía de afinidad implica interacciones mediante uniones selectivas tales como las presentes entre anticuerpos y antígeno o entre enzimas y sus sustratos. La cromatografía de intercambio iónico se utiliza para separar especies basándose en su carga molecular y su distribución de carga; la fase estacionaria posee carga positiva o negativa, y por ello tiene afinidad solamente con los solutos que poseen carga opuesta. Estos tres mecanismos de retención se pueden aplicar a solutos macromoleculares que están presentes en soluciones acuosas, y pueden funcionar perfectamente bajo condiciones suaves de temperatura y pH.

14.5 Cromatografía de exclusión molecular (filtración en gel)

Se ha observado que partículas de gel neutrales producen separaciones relacionadas con el tamaño de los componentes de una mezcla. Esto fue descubierto independientemente para polímeros disueltos en solventes orgánicos, y para biomoléculas en medios acuosos. La separación es no destructiva, y ocurre bajo condiciones suaves. Además, las separaciones son generalmente independientes de la composición de la fase móvil; así, la composición de la fase móvil se puede seleccionar de acuerdo a las características de la especie que es separada, para garantizar su estabilidad. Una desventaja de esta independencia es que no existen soluciones con gradientes de fuerza de elución para las separaciones de filtración de gel.

Las fases estacionarias usadas para la cromatografía de exclusión molecular (CEM) son partículas de geles, en los cuales el soluto puede penetrar a través del volumen macroscópico total de las partículas empacada en una columna. Las condiciones de separación se eligen para evitar la adsorción específica y no específica, de modo que los volúmenes de elución

dependan únicamente de los tamaños de los solutos, como resultado de tamizado molecular. Los volúmenes de elución nunca son mayores que el volumen total del lecho de la fase estacionaria. Los solutos grandes son eluidos primero, con las especies más pequeñas eluyéndose posteriormente, y no es inusual alcanzar una recuperación del 100% del soluto purificado. El primer gel usado para la separación y la purificación de proteínas fue Sephadex™, y este medio de gel es todavía de uso rutinario. Consiste en partículas de dextrano entrecruzado, y ha sido preparado con diversos tamaños de poro, para ser utilizado en diferentes rangos de fraccionamiento.

Una separación por CEM puede ser descripta por la Eq. 14.9:

$$V_e = V_o + K_{av} V_g \quad [14.9]$$

donde V_e es el volumen de elución del soluto, V_o (*void volume*) es el volumen muerto (o volumen de exclusión) de la columna (el volumen ocupado por la fase móvil), V_g es el volumen ocupado por el gel, y K_{av} (*av* = disponible) es el coeficiente de partición para el soluto entre la fase gel y el líquido circundante.³ Si la separación esta gobernada solamente por la exclusión estérica,

$$0 \leq K_{av} \leq 1 \quad [14.10]$$

La Figura 14.3 muestra una separación representativa de especies de pesos moleculares altos, intermedios y bajos.

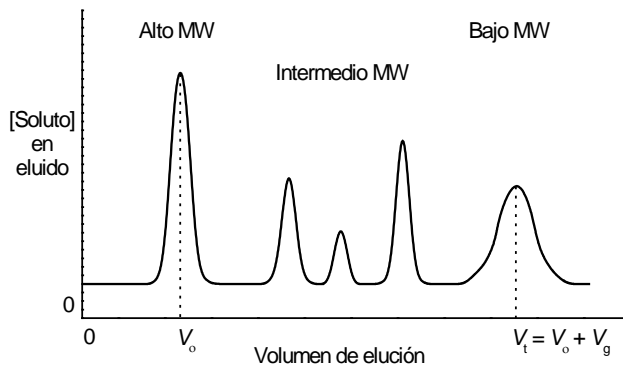


Figura 14.3. Un cromatograma representativo obtenido utilizando CEM.

Las especies con MW alto son demasiado grandes para entrar en los poros del gel, y así son eluidas en el volumen muerto. Las especies con MW muy bajos entran en todos los

3. C.J.O.R. Morris y P. Morris, "Separation Methods in Biochemistry", Wiley, New York, 1976, Capítulo 7, p. 418.

poros, y son por ello las últimas en eluirse. Las especies con MW intermedio se separan basándose en sus capacidades intermedias de entrar en y de salir de los poros del gel, con las moléculas más grandes tendiendo a ser excluidas más a menudo. El coeficiente de retención esta dado por:

$$R = V_o/V_e, \quad [14.11]$$

donde R es pequeño para los solutos altamente retenidos (pequeños), y se acerca a la unidad para los solutos de peso molecular elevado.

Las formas de los solutos también son importantes en su comportamiento de retención; se ha demostrado que los fragmentos obtenidos por la restricción del DNA (con forma de barra) tienen valores de K_{av} que son más sensibles al peso molecular que los obtenidos con proteínas desnaturalizadas (con forma de enrollamiento al azar, *random coil*). De hecho, el parámetro de la CEM que gobierna la retención es el volumen hidrodinámico del soluto, que se relaciona con su radio de giro (*radius of gyration*), R_g . El peso molecular de un soluto se relaciona con su radio de giro por la Eq. 14.12:

$$R_g = k(MW)^a, \quad [14.12]$$

donde $a = 1$ para barras, $a \approx 0,5$ para los enrollamientos al azar (*random coil*), y $a = 0,3$ para las esferas. De esta ecuación, es evidente que el radio de giro aumenta más rápidamente con el peso molecular para las barras (DNA) que para las esferas (proteínas). La Figura 14.4 muestra la dependencia de K_{av} del $\log(MW)$ para unas series de estándares de proteína y DNA.⁴

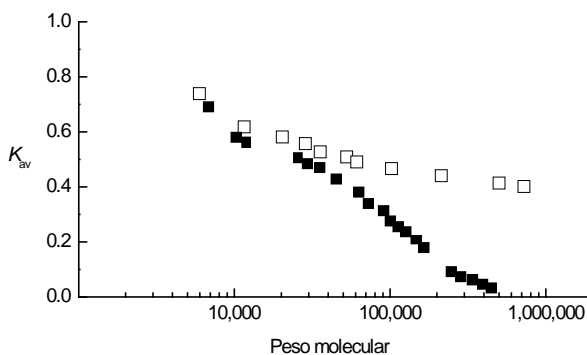


Figura 14.4. Curva de selectividad para CEM DNA (■) y estándares de peso molecular proteicos (□) sobre una columna de filtración en geles Superose 6 de 106 mm × 10 mm, utilizando como eluyente Tris-HCl 0,02 M pH 7,6 conteniendo 0,15 M NaCl.⁴ Reproducido, con permiso, de H. Ellegren y T. Låås, *Journal of Chromatography* **467**, 1989, 217-226. "Size - Exclusion Chromatography of DNA Restriction Fragments. Fragment Length Determinations and a Comparison with the Behaviour of Proteins in Size-Exclusion Chromatography". © 1989 Elsevier Science Publishers B.V.

4. H. Ellegren y T. Låås, *J. Chromatogr.* **467**, 1989, 217-226.

Para las proteínas, se ha desarrollado un modelo matemático de retención que funciona bien para geles de Sephadex.⁵ El soluto se trata como una esfera de radio r_s , mientras que el gel es una red representada por las barras rectas infinitamente largas, de radio r_x . Las barras se distribuyen aleatoriamente, y tienen una densidad media de L unidades de longitud de las barras por unidad de volumen del gel. Los valores de L y de r_x pueden ser calculados a partir de las dimensiones conocidas de las cadenas de dextrano, y entonces K_{av} puede ser encontrado utilizando la Eq. 14.13:

$$K_{av} = \exp\{-\pi L(r_x + r_s)^2\}$$

Esta ecuación ha sido utilizada para evaluar los radios hidratados de proteínas mediante la determinación experimental del K_{av} en tres geles de Sephadex, G-75 (fraccionamiento en el rango de 3-80 kD), G-100 (fraccionamiento en el rango de 4-150 kD) y G-200 (fraccionamiento en el rango de 5-600 kD). Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla 14.1, abajo.

Sustancia	K_{av} en Sephadex			r_s Angstroms
	G-75	G-100	G-200	
Citocromo c	0,43	0,59	0,72	16,4
Seroalbúmina humana	0,04	0,19	0,41	36,1
Inmunoglobulina G humana	0,00	0,05	0,21	55,5

Tabla 14.1. Determinación de r_s para proteínas utilizando CEM sobre Sephadex.⁵

Además de la exclusión estérica, otros tipos de interacciones entre el soluto y el gel son posibles. En particular, las atracciones electrostáticas pueden ser muy significativas con algunos geles, especialmente si el gel tiene grupos cargados y puede actuar como intercambiador iónico. Si el eluyente tiene fuerza iónica baja, estos grupos cargados crean un potencial de Donnan entre el interior y el exterior de las partículas del gel. Esto puede suceder si, por ejemplo, un soluto tiene una carga neta distinta a cero pero es demasiado grande para entrar en los poros del gel, mientras que sus contraiones pequeños pueden entrar en el gel. Esto da lugar a características de intercambio iónico en áreas localizadas del gel. Estos tipos de interacciones electrostáticas pueden ser suprimidas aumentando la fuerza iónica del eluyente. Esto se puede lograr usando electrólitos volátiles que pueden ser removidos fácilmente de los componentes de la muestra que son separados al finalizar el proceso cromatográfico.

La adsorción del soluto sobre la matriz del gel puede ocurrir también, pero no es un fenómeno común en la CEM. Puede ser dificultada cambiando el eluyente. El eluyente ideal

es un buen solvente para el soluto y la sustancia que forma la matriz del gel. Además, agentes que desestabilizan puentes de hidrógeno, tales como urea o guanidina, iones caotrópicos, o surfactantes pueden ser agregados a los eluyentes para mejorar las características de la CEM.

Para ensayar si existen interacciones de adsorción o electrostáticas, la separación CEM se realiza en una variedad de temperaturas. Si la separación ocurre solamente por tamaño, el coeficiente de retención $R (= V_o/V_e)$ es independiente de la temperatura; solo algunas variaciones muy pequeñas pueden ser observadas como resultado de la hinchazón del gel o de cambios microestructurales al gel. La presencia de una dependencia significativa de R respecto a T indica la presencia de un mecanismo distinto a la exclusión por tamaño. Mientras que R no debe variar con T , los coeficientes de difusión aumentan con T , y por ello ocurre el ensanchamiento de las zonas o bandas, dando lugar a una disminución de resolución con el aumento de temperaturas a la que ocurre la separación.

Normalmente, una relación aproximadamente lineal se observa entre K_{av} y el $\log(MW)$ sobre el rango de fraccionamiento del gel. La relación extendida es, de hecho, sigmoidea, según puede observarse en la Figura 14.5. La curva de calibración puede ser linealizada usando la transformación logit, donde $\text{logit}(K_{av}) = \ln(K_{av}/(1-K_{av}))$ se grafica versus el $\log(MW)$.

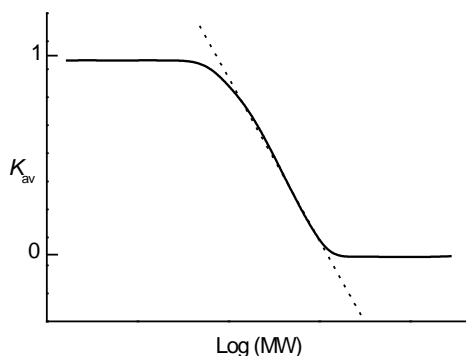


Figura 14.5. Curva de calibración de K_{av} vs $\log(MW)$.

La separación y resolución en el SEC son descritas por la ecuación de van Deemter (Eq. 14.7). Las contribuciones principales al ensanchamiento de las bandas, en orden de importancia, son las siguientes. El primer factor involucra la cinética de partición entre la fase móvil y el gel; hay una velocidad máxima a la que el equilibrio puede ser establecido, y esta velocidad depende del coeficiente de difusión del soluto. En segundo lugar, las diferencias en las longitudes de las diversas trayectorias en las que el flujo de la fase móvil puede moverse a través del gel empacado en la columna dan lugar a la denominada “difusión en remolino” (“*eddy diffusion*”); con una columna idealmente empacada, esto no es un problema significativo, pero en la práctica, la difusión en remolino puede ser significativa. Finalmente, la difusión longitudinal dentro de la columna contribuye al ensanchamiento de las bandas, pero este es un efecto relativamente pequeño.

El efecto de la velocidad de flujo (caudal) ha sido examinado como un factor que influencia el ancho de las bandas, y por lo tanto la resolución. La Figura 14.6 muestra un diagrama típico del ancho de las bandas en función del caudal. Cuando los caudales son bajos, la difusión longitudinal es significativa, y da lugar a mayores ensanchamientos de las bandas que en el óptimo. A caudales elevados, la cinética de la partición se convierte en el factor dominante, dando lugar a anchuras crecientes de las bandas y a una disminución de la resolución. La contribución de la difusión en remolino es independiente del caudal.

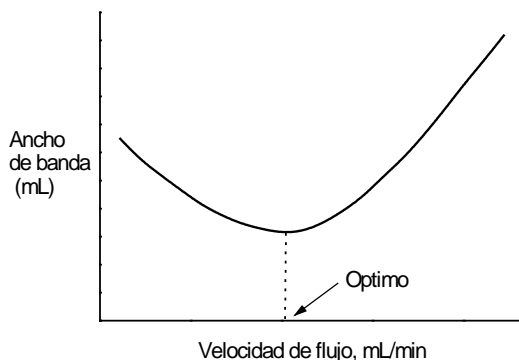


Figura 14.6. Ancho de las bandas obtenidos vs. velocidad de flujo de la fase móvil para CEM.

El tamaño de las partículas usadas en la fase estacionaria también se ha demostrado que ejerce un efecto significativo sobre la resolución. Las partículas pequeñas dan lugar al equilibrio rápido de los solutos, así como contribuciones más pequeñas a la difusión en remolino al ensanchamiento de las bandas. Sin embargo, hay una limitación práctica en el uso de partículas pequeñas. Cuanto más pequeña es la partícula, más alta es la resistencia al flujo de la fase móvil. Así, las partículas pequeñas requieren presiones más altas para eluir el soluto, para un dado caudal. Los geles usados en fases estacionarias del CEM son generalmente blandos, o elásticos, de modo que presiones altas pueden dar lugar a la compresión y a la obstrucción de la columna.

La temperatura a la que se realiza la separación también afecta la resolución, dado que los coeficientes de difusión aumentan con la temperatura, de modo que los equilibrios de partición son más rápidos a una T más alta. Este tiempo de equilibración es el factor que limita generalmente la resolución.

La longitud de la columna es importante, porque el número de platos teóricos (N) aumenta con la raíz cuadrada de la longitud de la columna; sin embargo, las limitaciones prácticas se imponen ante longitudes muy importantes de la columna. Los componentes eluidos de la columna se diluyen con respecto a sus concentraciones iniciales, y separaciones razonables rinden factores de dilución cercanos a 2, cuando se utilizan columnas de longitudes estándares (20 cm).

La composición de la fase móvil de la CEM no es, en principio, un factor importante. En la práctica, sin embargo, los efectos electrostáticos pueden ser importantes. Bajo condiciones fisiológicas (0,9% NaCl), el efecto Donnan es generalmente insignificante. El pH del eluyente puede ser alterado para cambiar la carga neta en las macromoléculas, para reducir al mínimo el efecto Donnan. Por ejemplo, la separación de ácidos nucleicos se realiza normalmente a pH bajo, de modo que algunos grupos fosfato estén protonados. En algunos casos, los grupos cargados en la fase estacionaria pueden ser químicamente removidos antes del empacado de la columna. Para las separaciones de proteínas, reactivos desnaturizantes, tales como urea o guanidina-HCl, son utilizados para producir polipéptidos en la conformación de enrollamiento al azar (*random coils*) para las determinaciones de peso molecular. El SDS y los agentes reductores de enlaces disulfuro también se pueden agregar a la fase móvil.

Finalmente, la viscosidad de las muestras puede ser importante si la concentración de macromoléculas es bastante alta como para contribuir al ensanchamiento de las bandas como resultado de un flujo inestable.

14.6 Matrices de gel para cromatografía de exclusión molecular⁶

Los geles usados para la CEM bioanalítica deben tener características hidrofílicas. Polisacáridos tales como el dextrano y la agarosa, así como diversos polímeros sintéticos, tales como la poliacrilamida, han sido utilizados con éxito para la CEM. Los monómeros y las cadenas de polímero de bajo peso molecular son solubles en agua, y deben ser entrecruzados para crear gránulos de gel insolubles. Algunos tipos de geles pueden ser secados y rehidratados reversiblemente, por ejemplo el dextrano. Estos son llamados aerogeles, y se sabe que mantienen una estructura abierta cuando se deshidratan. Los xerogeles, por otra parte, sufren encogimiento cuando se secan, e hinchazón cuando son rehidratados, de modo que pueden ocurrir alteraciones en el tamaño de poro. La Tabla 14.2 enumera algunos de los materiales comercialmente disponibles para la fase estacionaria de la CEM, junto con sus rangos de fraccionamiento de peso molecular, para proteínas globulares.

Los nombres comerciales de los medios de utilizados como fase estacionaria corresponden a determinados polímeros constituidos bajo condiciones bien controladas. SephadexTM consiste en dextrano, entrecruzado con epiclorohidrina (epichlorohydrin) en solución alcalina. SephacrylTM es un dextrano alílico, reticulado con N,N'-metilénbisacrilamida. SepharoseTM es una forma de gel de agarosa en gránulos, donde se forman agregados de las cadenas del polisacárido. El Bio-Gel PTM es un gel de poliacrilamida en gránulos, y tiene características

6. P.L. Dubin en "Advances in Chromatography", Vol. 31, J.C. Giddings, E. Grushka y P.R. Brown, Eds., Marcel Dekker, New York, 1992. Capítulo 2, pp. 121-125.

de separación similares al Sephadex™. El Biogel A™ es un gel de agarosa en gránulos, parecido a la Sepharose; tiene los tamaños de poro más grandes conocidos, y es incluso capaz de separar pequeñas partículas virales.

Nombre (™)	Rango de separación de MW, kD
Sephadex G-10	-0,7
Sephadex G-15	-1,5
Sephadex G-25	1,0-5,0
Sephadex G-50	1,5-3,0
Sephadex G-75	3,0-80
Sephadex G-100	4,0-150
Sephadex G-150	5,0-300
Sephadex G-200	5,0-600
Sephacryl S-100	1,0-100
Sephacryl S-200	5,0-250
Sephacryl S-300	10-1500
Sephacryl S-400	20-8.000
Sephacryl S-500	40-20.000
Sepharose 2B	70-40.000
Sepharose 4B	60-20.000
Sepharose 6B	10-4000
Bio-Gel P-2	0,1-1,8
Bio-Gel P-4	0,8-4,0
Bio-Gel P-6	1,0-6,0
Bio-Gel P-10	1,5-20
Bio-Gel P-30	2,5-40
Bio-Gel P-60	3,0-60
Bio-Gel P-100	5,0-100
Bio-Gel P-150	15-150
Bio-Gel P-200	30-200
Bio-Gel P-300	60-400
Bio-Gel A-0.5m	<10-500
Bio-Gel A-1.5m	<10-1500
Bio-Gel A-5m	<10-5000
Bio-Gel A-15m	40-15.000
Bio-Gel A-50m	100-50.000
Bio-Gel A-150m	1000-150.000

Tabla 14.2. Materiales de fase estacionaria para CEM (filtración en geles).

14.7 Cromatografía de afinidad

Se podría considerar que las técnicas cromatográficas tienen dos extremos. En uno de ellos, las columnas largas y eficientes, con baja o moderada selectividad son utilizadas para la separación de muestras formadas por mezclas complejas, las que son separadas en muchas bandas o picos correspondientes a sus componentes. Este es el caso para (a) la cromatografía en fase normal, donde la fase estacionaria es hidrofílica (sílica, alúmina) y la fase móvil es hidrofóbica; (b) la cromatografía en fase reversa, donde se utiliza una fase móvil acuosa o semi-acuosa y una fase estacionaria hidrofóbica, como por ejemplo cadenas hidrocarbonadas (C18) unido a sílica; (c) cromatografía de intercambio iónico y (d) filtración en gel.

El otro extremo implica el uso de columnas cortas, ineficaces y de muy alta selectividad para separar un número pequeño de componentes (a menudo solamente uno) de centenares de solutos que no son retenidos. Esta es la base de la cromatografía de afinidad. Como lo establece su nombre, la cromatografía de afinidad se basa en las interacciones específicas que ocurren entre agentes bioquímicos de reconocimiento y sus ligandos. La alta selectividad producida por estas interacciones puede lograr que las separaciones sean completas en un minuto o menos, usando columnas tan cortas como de 1 centímetro.

Los *ligandos de afinidad* son aquellas especies que están ligadas a un soporte sólido, formando la fase estacionaria. Pueden ser “específicos” en el sentido que un anticuerpo se une solamente un soluto o epítopo, o pueden ser “generales”, como por ejemplo los análogos de nucleótidos o lectinas, que se unen a ciertos grupos de solutos. Los ligandos de afinidad pueden tener un peso molecular bajo o alto: por ejemplo, un anticuerpo inmovilizado es un ligando de afinidad que puede ser utilizado para la purificación y la cuantificación del antígeno, mientras que un antígeno inmovilizado puede ser utilizado como ligando de afinidad para la purificación del anticuerpo. La Tabla 14.3 muestra ejemplos de un número de ligandos de afinidad generales y de sus selectividades.

Como ejemplo de los pasos involucrados en la cromatografía de afinidad, consideraremos la purificación de una enzima presente en una mezcla de proteínas, utilizando un inhibidor competitivo inmovilizado como ligando de afinidad. El primer paso después de la preparación de la columna es la aplicación de la muestra; durante este paso, la enzima que se une al inhibidor es retenida, o “adsorbida” en la columna. Esto es seguido por un paso de lavado, en el que se remueven o eliminan todas las especies no unidas a la fase estacionaria. El tercer paso implica la elución, y este paso debe implicar una revocación de la unión entre la enzima y el inhibidor; esto se puede realizar por un cambio en el pH, o bien el uso de un eluyente que contenga el sustrato o el inhibidor en solución. Finalmente, la columna es regenerada regresando a la composición inicial de la fase móvil. La cromatografía clásica de afinidad emplea la alimentación de la fase móvil por simple gravedad, a través de una columna vertical, mientras que la cromatografía de afinidad de alto rendimiento (HPAC) utiliza una bomba para forzar fase móvil a través de la columna. HPAC permite el uso de

partículas más pequeñas en la fase estacionaria, rindiendo columnas con eficacias más altas, siendo utilizado el mismo equipo básico que en los métodos de HPLC (bomba, válvula inyectora, columna, detector, registrador).

Ligando(s)	Selectividad
Colorante azul de cibacron, o derivados de AMP, NADH o NADPH	Enzimas dehidrogenasas, mediante unión al sitio específico para NAD(P)H
Lectinas: concanavalina A, lectina de lenteja, lectina de germen de trigo	Polisacáridos, glicoproteínas, glicolípidos y proteínas de membrana con azúcares en ciertas configuraciones
Inhibidor de tripsina, metil ésteres de aminoácidos, o D-aminoácidos	Proteasas
Acido fenilborónico	Especies conteniendo grupos cis-diol, como hemoglobinas glicosiladas, azúcares, ácidos nucleicos
Proteína A	Inmunoglobulinas, unión a través del fragmento F _c
Ácidos nucleicos, nucleósidos o nucleótidos	Nucleasas, polimerasas, ácidos nucleicos

Tabla 14.3. Ligandos de afinidad generales y sus moléculas afines.⁷

Un medio soporte ideal para la cromatografía de afinidad (AC) debe ser rígido, estable, tener una elevada área superficial, y no adsorber ninguna especie inespecíficamente. La AC clásica emplea geles orgánicos, tales como dextrano, agarosa, celulosa o poliacrilamida como materiales de la fase estacionaria. Por ejemplo, la Sepharose 6B tiene un 6% de agarosa, un tamaño de partícula de 100 μm , poros con un promedio de 150 \AA de diámetro, y un rango de operación entre pH 4-7. Puede soportar solamente 1 psi de presión, pero puede ser entrecruzado con 2,3-dibromopropanol para mejorar su estabilidad química y mecánica. La forma entrecruzada se puede utilizar entre pH 2-9, y hasta 6 psi de presión.

Los materiales soportes para cromatografía de afinidad llamados de “mediana performance” pueden soportar presiones más altas, y tienen tamaños de partícula de alrededor 40 μm . Algunos ejemplos incluyen poliacrilamidas hidrofílicas (pH 1-14, 100 psi), así como los soportes de vidrio de poro controlado (CPG), compuestos principalmente de sílice y que pueden ser adquiridos sin o con distintos ligandos unidos a su superficie (pH 2-8, 1000 psi).

La cromatografía de afinidad de alto rendimiento emplea partículas de sílice de 10 μm , que tienen tamaños de poro de 300 \AA , así como partículas no porosas con un diámetro de

7. C.R. Lowe, “An Introduction to Affinity Chromatography”, Elsevier, New York, 1979. Capítulo 5, pp. 428-465.

1,5 μm o menos. Con estos materiales soportes, presiones en exceso de 2500 psi pueden ser utilizadas, y éstas son las presiones comúnmente utilizadas en sistemas de HPLC.

14.7.1 Inmovilización de ligandos de afinidad

Los ligandos de afinidad se inmovilizan mediante uniones covalentes con el material soporte. Es deseable obtener una cobertura densa y estable del material soporte, y para ello la mayoría de los métodos de inmovilización utilizan dos pasos: activación del material soporte y posterior unión del ligando de afinidad (véase la Sección 4.2 con respecto a los métodos de inmovilización de enzimas).

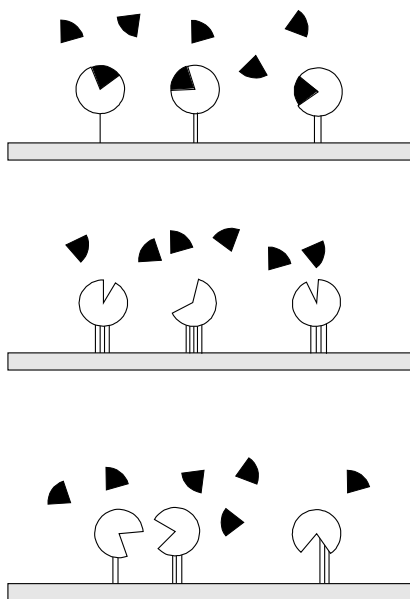


Figura 14.7. Efectos de la inmovilización en una macromolécula.⁸ Arriba: inmovilización ideal; centro: estructura tridimensional alterada; y abajo: orientación y espaciamiento incorrectos.

Un método de inmovilización eficaz debe considerar los siguientes factores. Los grupos funcionales en el ligando que están disponibles para la unión al soporte pueden ser uno o más de los siguientes; amina, tiol, alcohol, y ácido carboxílico. A menudo es necesaria la utilización de brazos espaciadores cuando ligandos pequeños son inmovilizados, de modo que el ligando inmovilizado pueda tener acceso al sitio de unión de una macromolécula; estos espaciadores son a menudo cadenas hidrocarbonadas substituidas, y pueden alterar las características de las uniones del ligando mediante interacciones hidrofóbicas o iónicas (los espaciadores hidrofílicos neutrales tales como el polietilenglicol han sido muy eficaces). El pH durante la inmovilización debe ser controlado, puesto que éste determina la reactividad

de los grupos funcionales y puede causar daño irreversible del ligando o del material soporte a valores extremos. Finalmente, la densidad de grupos activos en el material soporte debe ser considerada: la unión de ligandos grandes mediante uniones múltiples al material soporte da lugar a mayor estabilidad, pero puede distorsionar el sitio de unión y disminuir la afinidad; una orientación o espaciamiento incorrecta de los ligandos puede también conducir a una reducción de la afinidad, por ello deben optimizarse las condiciones de la inmovilización. La Figura 14.7 ilustra los efectos de algunos de estos factores.⁸

Muchos materiales soporte se encuentran comercialmente disponibles en una forma pre-activada, requiriendo solamente el paso de unión del ligando de afinidad deseado. Estos materiales tienen ya un brazo espaciador incorporado, y poseen grupos funcionales activos para la inmovilización del ligando. La Tabla 14.5 presenta un número de reacciones de materiales soportes activados con los grupos funcionales de ligandos. Para todas las reacciones ilustradas, el grupo R del ligando puede ser una molécula pequeña, tal como un hapteno o un inhibidor, o una macromolécula, tal como una proteína, un carbohidrato o un ácido nucleico que se ha modificado, en caso de necesidad, para poseer al grupo funcional indicado.

Método de activación	Reacción con ligando de afinidad
Bromuro de cianógeno	$\text{---O-C}\equiv\text{N} + \text{RNH}_2 \longrightarrow \text{---O-C}\begin{array}{c} \text{NH} \\ \parallel \end{array}\text{-NHR}$
N-Hidroxisuccinimida ester (NHS)	$\text{---C}\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \end{array}\text{-O-N}\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \end{array}\text{C} + \text{RNH}_2 \longrightarrow \text{---C}\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \end{array}\text{-NHR}$
Epóxido	$\text{---CH}\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \diagdown \end{array}\text{-CH}_2 + \text{RNH}_2 \xrightarrow{(\text{RSH}, \text{ROH})} \text{---CH}\begin{array}{c} \text{OH} \\ \end{array}\text{-CH}_2\text{-NHR}$
2,2,2-trifluoroetanosulfonil cloruro	$\text{---CH}_2\text{-OSO}_2\text{-CH}_2\text{CF}_3 + \text{RNH}_2 \xrightarrow{(\text{RSH})} \text{---CH}_2\text{-NHR}$
Carbonildiimidazol	$\text{---O-C}\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \end{array}\text{-N}\begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{N} \end{array} + \text{RNH}_2 \longrightarrow \text{---O-C}\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \end{array}\text{-NHR}$
Intercambio tiol/disulfuro	$\text{---S-S-}\begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{N} \end{array} + \text{RSH} \longrightarrow \text{---S-S-R}$
Diazonio	$\text{---C}_6\text{H}_4\text{-N}\equiv\text{N}^+ + \text{R-C}_6\text{H}_4\text{-OH} \longrightarrow \text{---C}_6\text{H}_4\text{-N=N-C}_6\text{H}_3(\text{OH})\text{-R}$

Tabla 14.4. Reacciones de activación para materiales soporte utilizados con ligandos de afinidad.

8. R.R. Walters, *Anal. Chem.* **57**, 1985, 1099A-1101A.

14.7.2 Métodos de elución

Los métodos de elución se clasifican como bio-específicos o no-específicos. La elución bio-específica se logra por la adición de un inhibidor o de un competidor de bajo peso molecular a la fase móvil, causando unión competitiva. Por ejemplo, la unión entre glucosamina inmovilizada y una lectina se puede revertir por la adición de glucosa como modificante a la fase móvil; la glucosa en el eluyente interactúa con los sitios de unión de la lectina, entonces el complejo lectina-glucosa es eluido de la columna. La glucosamina inmovilizada y la glucosa soluble en el eluyente compiten por los sitios de unión en la lectina (analito). Por otra parte, si la lectina se inmoviliza para la purificación de una glicoproteína, la glucosa se puede utilizar otra vez como modificante de la fase móvil, pero en este caso la glucosa desplazará la glicoproteína de la columna por la competición con el analito (glicoproteína) por los sitios de unión inmovilizados de la lectina. En este caso, la glicoproteína libre se eluye.

Los métodos no específicos de elución también son comúnmente utilizados en cromatografía de afinidad. Estos métodos se utilizan para inducir la rotura de las uniones entre el analito y la fase estacionaria, y pueden consistir en una o más de las siguientes modificaciones en la fase móvil: (a) cambio de pH, por ejemplo de 7 a 3; (b) adición de desnaturizantes tales como urea o guanidina; (c) adición de iones caotrópicos tales como tiocianato o perclorato; (d) adición de solventes orgánicos; o (e) cambio de la fuerza iónica. Las condiciones de elución se deben determinar empíricamente, y deben ser bastante suaves como para no dañar el soporte sólido, el ligando y el analito irreversiblemente. Los métodos no específicos de elución son generalmente más rápidos que los métodos específicos, debido a que la velocidad de disociación entre el analito y la fase estacionaria se incrementa. Esto da lugar a menor ensanchamiento de las bandas, o a la elución de una muestra más concentrada.

La Figura 14.8 ilustra una separación cromatográfica de afinidad de cinco isoenzimas de la lactato deshidrogenasa humana, usando como ligando de afinidad inmovilizado adenosina-5'-monofosfato (AMP), y elución bio-específica utilizando un gradiente continuo de concentración de NADH.⁹ El AMP es un inhibidor competitivo de la lactato deshidrogenasa, y se une en el sitio de unión para el NADH. El AMP fue fijado covalentemente a una fase estacionaria de Sepharose. Este tipo de separación se puede lograr usando métodos bio-específicos de elución, pero no sería posible con métodos de elución no específicos, dado que son esperables cambios significativos en las estructuras de las diferentes isoenzimas, lo que dará lugar al ensanchamiento de las bandas eluidas.

9. P. Brodelius y K. Mosbach, *FEBS Lett.* **35**, 1973, 223-226.

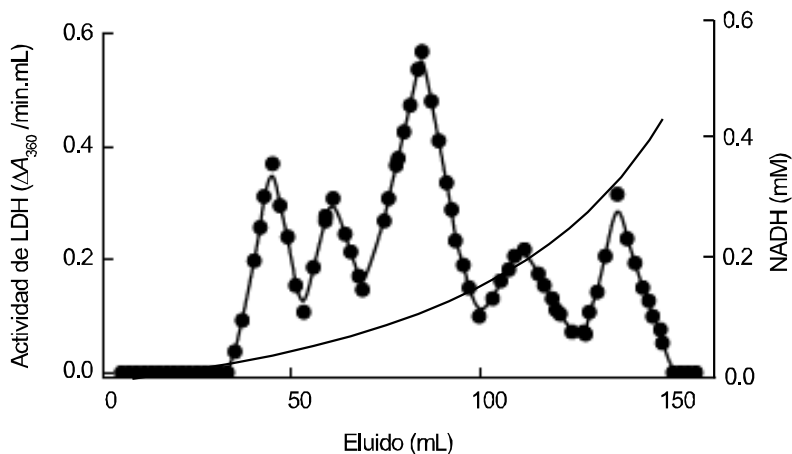


Figura 14.8. Bio-elución de isoenzimas de LDH separadas en una columna de afinidad Sepharose-AMP utilizando un gradiente cóncavo de NADH. Reproducido, con permiso, de P. Brodelius y K. Mosbach, *FEBS Lett.* **35**, 1973, 223-226. "Separation of the Isoenzymes of Lactate Dehydrogenase by Affinity Chromatography Using an Immobilized AMP-Analogue". The exclusive © for all languages and countries is vested in the Federation of European Biochemical Societies.

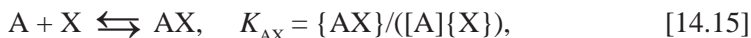
14.7.3 Determinación de las constantes de asociación mediante cromatografía de afinidad de alta performance¹⁰

Las constantes de asociación para las reacciones de biomoléculas con sus ligandos se pueden evaluar usando cromatografía de afinidad. Básicamente, un ligando de afinidad inmovilizado compite con un ligando soluble para los sitios de unión de la biomolécula, y el volumen de retención de la biomolécula se mide en función de la concentración del ligando soluble. Las muestras inyectadas contienen una concentración fija de la biomolécula, mientras que la concentración del ligando soluble es una variable.

La aproximación teórica utilizada para relacionar los volúmenes de retención con las constantes de asociación se basa en un modelo que consiste en una biomolécula monomérica que tiene un único sitio de unión (esto es, es aplicable a fragmentos F_{ab} de anticuerpos, pero no a las inmunoglobulinas intactas). La biomolécula interactúa con un ligando inmovilizado y un ligando soluble, cada uno de los cuales también tiene un solo sitio de unión. El modelo se representa en la Figura 14.9. Debido a la aplicabilidad general del modelo, la biomolécula se representa como A, y el ligando inmovilizado y el soluble se representan con los símbolos X y L, respectivamente. Por lo tanto, las especies a considerar que desarrollan relaciones

10. A. Jaulmes y C. Vidal-Madjar en "Advances in Chromatography", Vol. 28, J.C. Giddings, E. Grushka y P.R. Brown, Eds., Marcel Dekker, New York, 1989. Capítulo 1, pp. 11-39.

de equilibrio son A, X, L, AX y AL, y se encuentran relacionadas a través de las siguientes ecuaciones de equilibrio:



donde las concentraciones molares son representadas por corchetes [mol/L], y las concentraciones en la superficie se muestran entre paréntesis {mol/cm²}. Las únicas especies que se encuentran en la superficie de las partículas de la fase estacionaria que se presenta usando concentraciones superficiales son X y AX.

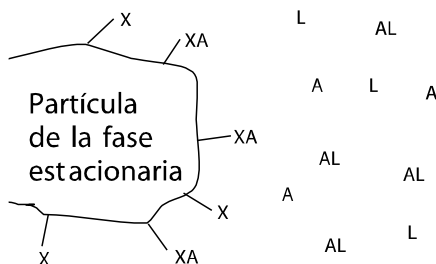


Figura 14.9. Modelo de las especies presentes durante la elución bio-específica de la biomolécula A de una columna que tiene inmovilizado el ligando de afinidad X, utilizando el ligando L.

Las únicas consideraciones necesarias son (i) que A, X y L son univalentes (esto implica que epitopes idénticos están presentes en X y L para ligar a A), (ii) que el ligando soluble L no interactúa con X o XA, y (iii) que no existe interacción no específica de A o L con las partículas de la fase estacionaria.

Utilizando expresiones para el balance de masas, la concentración total de A en la fase móvil, $[A]_t$, y la cantidad total de A unida a la fase estacionaria, Q_A , se pueden representar por las Eqs. 14.16 y 14.17:

$$[A]_t = [A] + [AL] \quad [14.16]$$

$$Q_A = \{AX\} \times (\text{área superficial}) \quad [14.17]$$

donde $[A]_t$ es una concentración representada en unidades de molaridad y Q_A es la cantidad total dada en moles. Dada la cantidad total de ligando inmovilizado, Q_X , se representa en una forma similar a la Eq. 14.17, como:

$$Q_x = (\{X\} + \{AX\}) \times (\text{área superficial}), \quad [14.18]$$

entonces el cociente Q_A a Q_x es simplemente el cociente de la concentración superficial:

$$Q_A/Q_x = \{AX\}/(\{X\} + \{AX\}) \quad [14.19]$$

Usando la expresión para K_{AX} dada en la Eq. 14.15 para sustituir a $\{AX\}$, y reordenando para cancelar $\{X\}$ se obtiene:

$$Q_A/Q_x = [A]K_{AX}/(1 + [A]K_{AX}) \quad [14.20]$$

Ahora, la Eq. 14.16 se pueden utilizar para sustituir $([A]_t - [AL])$ por $[A]$, y K_{AL} (Eq. 14.14) se introduce para sustituir $[AL]$, obteniéndose la Eq. 14.21:

$$Q_A = (Q_x [A]_t K_{AX}) / (1 + [A]_t K_{AX} + [L] K_{AL}) \quad [14.21]$$

Una expresión general que relaciona volúmenes de retención con el Q_A para muchas formas de cromatografía se muestra en la Eq. 14.22:

$$V_r - V_o = (\delta Q_A / \delta [A]_t)_{[A]_t=0} \quad [14.22]$$

donde V_r es el volumen de retención sin corregir, V_o es el volumen muerto de la columna, y el resultado se evalúa $[A]_t=0$ de modo que la disponibilidad de sitios de unión en la fase estacionaria no limite la reacción. Realizando la derivada de la Eq. 14.21 con respecto a $[A]_t$, y evaluándolo a $[A]_t=0$ rinde la Eq 14.23:

$$V_r - V_o = (Q_x K_{AX}) / (1 + [L] K_{AL}), \quad [14.23]$$

la que se reordena para dar lugar a la forma final usada en la determinación experimental de K_{AL} :

$$1/(V_r - V_o) = 1/(Q_x K_{AX}) + [L] K_{AL} / (Q_x K_{AX}). \quad [14.24]$$

En la Eq 14.24, puede observarse que V_o , Q_x , K_{AX} y K_{AL} son todas constantes. Los volúmenes de retención se miden en función de $[L]$, y un diagrama de $1/(V_r - V_o)$ respecto a $[L]$ es construido. Este diagrama es lineal, y el cociente de la pendiente respecto al valor de corte del eje y es una manera de obtener el valor de K_{AL} . Observe que este método no requiere el conocimiento de Q_x o K_{AX} para la determinación de K_{AL} . Debe también observarse que $[L]$ es la concentración libre del ligando ($[L] = [L]_t - [AL]$), pero en la práctica, $[L] \approx [L]_t$ porque $[L]_t$ es generalmente mucho mayor que $[A]_t$.

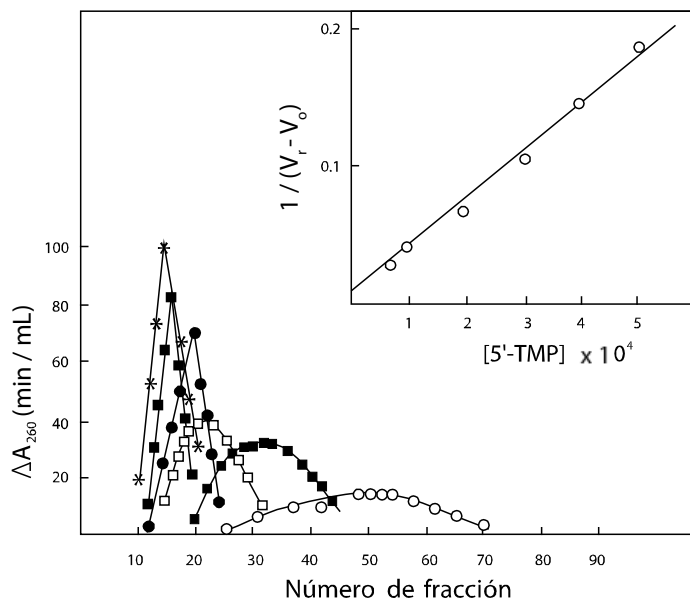


Figura 14.10. Perfil de elución de RNasa en función del $[5'-\text{TMP}]$ libre, utilizando una columna de afinidad con $5'-\text{TMP}$ inmovilizado. Las concentraciones de $5'-\text{TMP}$ en la fase móvil fueron $5,0 \times 10^{-4}$ M, $4,0 \times 10^{-4}$ M, $3,0 \times 10^{-4}$ M, $2,0 \times 10^{-4}$ M, $1,0 \times 10^{-4}$ M, y $7,5 \times 10^{-5}$ M para las fracciones eluidas, desde las primeras a las últimas, respectivamente. El inserto muestra la figura de acuerdo a la Eq. 14.24 que fue utilizada para determinar la constante de asociación para la reacción de unión de la RNase- $5'-\text{TMP}$.¹¹ Reproducido, con permiso, de B.M. Dunn y I.M. Chaiken, *Biochemistry* 14 (N° 11), 1975, 2343-2349. "Evaluation of Quantitative Affinity Chromatography by Comparison with Kinetic and Equilibrium Dialysis Methods for the Analysis of Nucleotide Binding to Staphylococcal Nuclease". © 1975 by American Chemical Society.

Un ejemplo de este tipo de experimento puede observarse en la Figura 14.10.¹¹ La información deseada es la constante de asociación para la unión de la ribonucleasa (RNasa) y la timidina $5'$ -monofosfato ($5'-\text{TMP}$). Una fase estacionaria fue preparada utilizando Sepharose, con TMP unida dando lugar a timidina $3'$ -(p-Sepharose-aminofenilfosfato)- $5'$ -fosfato (es decir, $5'-\text{TMP}$ fue inmovilizado a través del grupo $3'$ -hidroxil sobre la fase estacionaria). RNasa purificada fue inyectada en las fases móviles que contenían concentraciones de $5'-\text{TMP}$ en el rango de $7,5 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ M. En este experimento, el eluido se colectó en fracciones de volumen constante, y las absorbancias de las fracciones fueron medidas a 260 nm. Una versión más moderna de este experimento utilizaría simplemente un detector UV con una celda de flujo, y la absorbancia se mediría en función de tiempo a un caudal constante; los volúmenes de elución de la RNasa pueden ser calculados multiplicando el caudal

11. B.M. Dunn y I.M. Chaiken, *Biochemistry* **14**, 1975, 2343-2349.

por los tiempos de retención. Es fácil de apreciar en la Fig. 14.10 que concentraciones más altas de 5'-TMP libre rinden volúmenes de retención más pequeños, puesto que la RNasa se eluye en fracciones más tempranas. El inserto muestra un diagrama de $1/(V_r - V_o)$ versus $[5'\text{-TMP}]$, de acuerdo a la Eq. 14.24, y el valor de K_{AL} , determinado dividiendo la pendiente de este diagrama por el punto de intersección del eje y es $3,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

14.8 Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se basa en el equilibrio del soluto entre el solvente, o fase móvil, y los sitios cargados fijados en la fase estacionaria. Las columnas de intercambio aniónico tienen sitios catiónicos inmovilizados, y los solutos aniónicos son retenidos; la cromatografía de intercambio catiónico utiliza columnas con sitios aniónicos inmovilizados, por lo que especies catiónicas son retenidas. Para las separaciones de biopolímeros, las columnas de intercambio iónico utilizan geles como fase estacionaria, entre ellos la celulosa, dextrano, agarosa y poliacrilamida. Estos medios de gel se derivatizan para crear grupos cargados inmovilizados. Los intercambiadores de iones se clasifican como fuertes o débiles, dependiendo de si la cantidad de carga inmovilizada puede fácilmente ser controlada con el pH de la fase móvil. La Tabla 14.5 muestra los grupos funcionales representativos generados en los geles por métodos químicos, así como su clasificación.

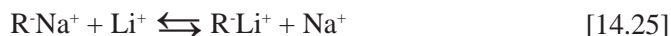
Tipo	Clasificación	Nombre	Grupo funcional
Cation	Acido fuerte	Sulfopropil (SP)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{H}^+$
	Acido débil	Carboximetil (CM)	$-\text{OCH}_2\text{COO}^-\text{H}^+$
Anión	Base fuerte	Trietilaminoetil (TEAE)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$
	Base intermedia	Dietilaminoetil (DEAE)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
	Base débil	p-Aminobencil (PAB)	$-\text{OCH}_2(\text{C}_6\text{H}_4)\text{NH}_2$

Tabla 14.5. Grupos funcionales representativos en los geles de intercambio iónico.

Para cualquier separación por cromatografía de intercambio iónico, la opción de un intercambiador fuerte o débil depende del pH utilizado en el experimento y de la selectividad requerida. Los ácidos débiles están protonados a $\text{pH} \leq 4$, de modo que pierden su capacidad de intercambio iónico a pHs bajos; de similar manera, los intercambiadores de iones básicos débiles e intermedios pierden sus cargas a pHs altos. Además, fases móviles con elevada fuerza iónica tienden a disminuir la fuerza de la interacción entre los solutos cargados y la fase estacionaria. Por lo tanto, el pH y/o los gradientes de fuerza iónica se utilizan para eluir los distintos componentes de una mezcla. Utilizando cromatografía de

intercambio catiónico, gradientes de pH alto a bajo son utilizados, o bien gradientes de baja a alta fuerza iónica (por ejemplo aumentando la [HCl] durante la elución). Las columnas de intercambio aniónico utilizan gradientes de pH bajo a alto, o bien de fuerza iónica baja a alta (por ejemplo aumentando la [NaOH] durante la elución).

El modelo clásico de selectividad¹² en la cromatografía de intercambio iónico se basa en el intercambio estequiométrico; por ejemplo, la competición entre Na⁺ y Li⁺ para los sitios de unión en un intercambiador de cationes (R⁻):



El *coeficiente de selectividad* para este modelo clásico es la constante de equilibrio termodinámica para esta reacción:

$$K = [R \cdot Li^+][Na^+]/[R \cdot Na^+][Li^+]. \quad [14.26]$$

Este modelo clásico funciona bien para iones pequeños, inorgánicos, pero no describe adecuadamente las interacciones de macromoléculas biológicas, tales como proteínas y ácidos nucleicos, con las resinas de intercambio iónico. Con estas especies polielectrolíticas, las interacciones electrostáticas no siguen leyes estequiométricas simples, y las múltiples cargas no son todas simultáneamente accesibles al intercambio iónico. Por esta razón, un modelo más elaborado se ha desarrollado para explicar el comportamiento de polielectrolitos.

14.8.1 Modelo de retención para la cromatografía de intercambio iónico de polielectrolitos¹³

Una expresión que relaciona el factor de la capacidad $k = (V_r - V_o)/V_o$ (y Eq. 14.3) a la energía libre de Gibbs de la retención, ΔG_{ret} , ha sido desarrollada como relación general que puede ser aplicada a todos los mecanismos de retención. Esta expresión muestra en la Eq. 14.27:

$$\ln(k) = -\Delta G_{ret}/RT + \ln(\phi), \quad [14.27]$$

donde ϕ es el cociente de las fases en la columna, y es igual al volumen ocupado por la fase estacionaria dividido por el ocupado por la fase móvil (el volumen muerto) de la columna:

12. H.F. Walton y R.D. Rocklin, "Ion-Exchange in Analytical Chemistry", CRC Press, Boca Raton, Fl., 1990. Capítulo 3, pp. 40-42.

13. J. Ståhlberg, B. Jönsson, y C. Horváth, *Anal. Chem.* **63**, 1991, 1867-1874.

$$\phi = V_s/V_o, \quad [14.28]$$

y el valor de ϕ se considera una constante para una columna dada. El valor de ΔG_{ret} varía con las condiciones experimentales, de modo que los factores de capacidad varían con el pH, la fuerza iónica y la temperatura, dependiendo de la susceptibilidad del equilibrio de retención a estos parámetros.

Un modelo se ha desarrollado para describir la dependencia de ΔG_{ret} de las interacciones electrostáticas entre la fase estacionaria y una molécula de un polielectrolito. Se basa en la consideración de una interacción entre dos superficies planas cargadas, que están en contacto con una solución salina tamponada. Este tratamiento puramente electrostático da lugar a la Eq. 14.29:

$$-\Delta G_{\text{ret}} = A_p \sigma_p^2 \{RT\}^{1/2} / (F\{2I\epsilon_o\epsilon_r\}^{1/2}) \quad [14.29]$$

donde A_p es el área de la superficie de la proteína (o polielectrolito) que interactúa con la fase estacionaria (se asume igual a la mitad del área superficial total de una esfera), σ_p es la densidad de carga en la proteína (la carga total a un dado pH dividida por área superficial total), F es la constante de Faraday, I es la fuerza iónica de la fase móvil, ϵ_o es la constante dieléctrica (permisividad) del vacío, y ϵ_r es la constante dieléctrica de la fase móvil. La Figura 14.11 muestra cómo la energía libre varía con distancia entre la fase estacionaria cargada y la superficie de la proteína.

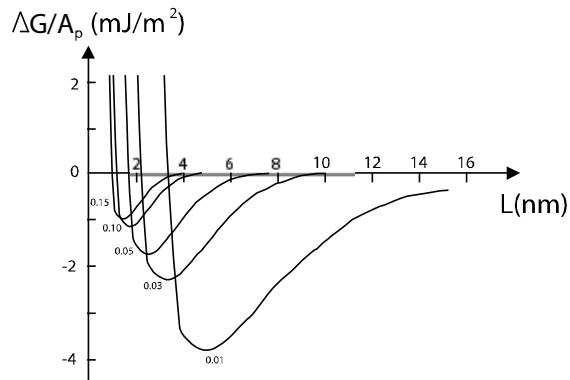


Figura 14.11. Diagramas de energía libre de Gibbs por unidad de área, $\Delta G/A_p$, en función de la distancia entre las dos superficies opuestas cargadas, L , para distintas fuerzas iónicas. Los resultados fueron calculados usando $\epsilon_r=80$, y fijando como densidades de carga de las fases estacionaria y móvil $-0,16$ y $+0,03$ C/m², respectivamente.¹³ Reproducido, con permiso, de J. Ståhlberg, B. Jönsson, and C. Horváth, *Anal. Chem.* **63**, 1991, 1867-1874. "Theory for Electrostatic Interaction Chromatography of Proteins". © 1991 by American Chemical Society.

Substituyendo la Eq. 14.29 en la Eq. 14.27 y reagrupando rinde la Eq. 14.30:

$$\ln(k) = \{A_p \sigma_p^2 / (F \{2RT \epsilon_o \epsilon_r\}^{1/2})\} \{1/I\}^{1/2} + \ln(\phi) \quad [14.30]$$

Esta ecuación describe correctamente la dependencia lineal del $\ln(k)$ sobre $I^{-1/2}$ y además permite el cálculo de la carga neta en una proteína utilizando la pendiente de este diagrama, a condición de que el área superficial (o el radio) de la proteína sea conocida. Las constantes en la pendiente pueden ser evaluadas, bajo condiciones de una fase móvil acuosa a 25 °C con $0,05 \leq I \leq 0,5$ M, de tal manera que la carga neta, q este dada por:

$$q = \{(\text{pendiente})(\text{área superficial})/135\}^{1/2} \quad [14.31]$$

donde el área superficial esta dada en unidades de Å^2 .

La Figura 14.12 muestra los diagramas de $\ln(k)$ versus $I^{-1/2}$ obtenidos para el quimotripsinógeno, la lisozima, y el citocromo c en una columna de intercambio catiónico débil utilizando una solución tampón de pH 6,0. A excepción del diagrama no lineal del quimotripsinógeno a baja fuerza iónica, los diagramas muestran buenas linealidades sobre una amplia gama de I , y la Eq. 14.31 fue utilizada para evaluar las cargas netas de la lisozima y del citocromo c, obteniéndose valores de +10,6 y +10,7, respectivamente.

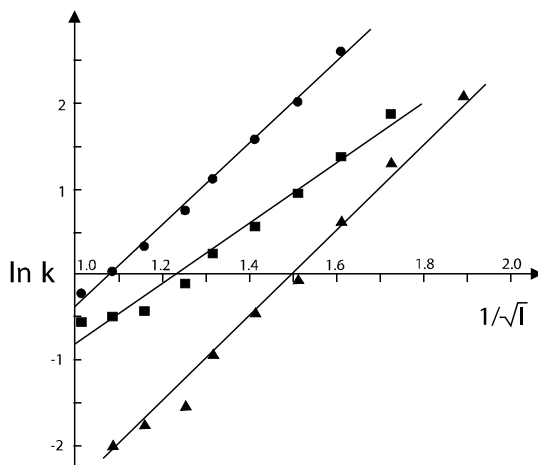


Figura 14.12. Diagramas del logaritmo del factor de retención para proteínas, en función de la raíz cuadrada recíproca de la fuerza iónica en cromatografía de intercambio iónico de α -quimotripsinógeno (cuadrados), lisozima (círculos), y citocromo c (triángulos). Una resina Zorbax Bioseries WCX300 (intercambiador catiónico débil) fue utilizado a pH 6,0, con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como la sal de elución.¹³ Reproducido, con permiso, de J. Ståhlberg, B. Jönsson, y C. Horváth, *Anal. Chem.* **63**, 1991, 1867-1874. "Theory for Electrostatic Interaction Chromatography of Proteins". © 1991 by American Chemical Society.

Experimentos similares a los presentados en la Figura 14.12 han sido realizados para una gran cantidad de proteínas, en diferentes condiciones de pH, y utilizando distintas fases móviles y sales para la elución. Los valores de carga neta calculados utilizando los diagramas cromatográficos, q_{chr} , han sido comparados con los valores experimentales previamente obtenidos por titulación, q_{titr} . Los resultados de estos experimentos se pueden observar en la Tabla 14.6, donde también se tabulo el cociente $q_{\text{chr}}/q_{\text{titr}}$, cocientes que deber ser cercanos a la unidad si las presunciones inherentes al modelo son válidas.

Algunas discrepancias se pueden observar en la Tabla 14.6 entre los valores de carga neta obtenidos por el método cromatográfico y por titulación, q_{chr} y q_{titr} . Si $q_{\text{chr}}/q_{\text{titr}} > 1$, se ha postulado que la proteína puede tener una distribución no uniforme de carga, de modo que la densidad aparente de carga sea más alta sobre algunas áreas de la superficie que interactúan más fuertemente con la fase estacionaria. Si $q_{\text{chr}}/q_{\text{titr}} < 1$, entonces puede postularse que la proteína posee una mayor densidad de carga que la superficie de la fase estacionaria, entonces las propiedades de la fase estacionaria dominan las interacciones electrostáticas. En general, se encuentra una correlación muy alta entre los valores obtenidos utilizando los dos métodos descriptos. Dado que se utilizan solo constantes fundamentales para la estimación cromatográfica de q , y que no existen parámetros ajustables, como en los modelos previos, esta es la mejor teoría cuantitativa existente que describe la retención cromatográfica de polielectrolitos en columnas de intercambio iónico. Su aplicabilidad a otros biopolímeros, como por ejemplo las moléculas fuertemente cargadas de ácidos nucleicos, todavía debe ser determinada.

Proteína	pH eluyente	Fase estacionaria (a)	Sal de elución	r (b)	q_{cro}	q_{finu}	q_{cro} / q_{finu}
Mioglobina (músculo de caba- llo)	6,0	Zorbax Bio Series 300 (WCX)	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,996	+6,9	+4,8	1,44
Ribonucleasa	6,0	Zorbax Bio Series 300 (WCX)	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,991	+8,8	+6,1	1,44
	6,4	Zorbax Bio Series 300 (WCX)	NaOAc	0,995	+9,5	+5,4	1,76
	6,4	Zorbax Bio Series 300 (SCX)	NaOAc	0,994	+8,3	+5,4	1,54
Citocromo c	4,9	Resina no comercial (WCX)	Cat(OAc) ₂	0,999	+8,6	+8,9	0,97
	6,0	Zorbax Bio Series 300 (WCX)	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,996	+10,7	+7,2	1,49
	6,0	Zorbax Bio Series 300 (SCX)	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,994	+8,6	+7,2	1,19
	7,8	Zorbax Bio Series 300 (WAX)	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,994	-18,5	-15,0	1,23
BSA	7,8	Zorbax Bio Series 300 (SAX)	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,990	-14,8	-15,0	0,99
β -lactoglobulina A	7,0	SynChropak AX300 (WAX)	NaCl	0,992	-21,3	-13,5	1,58
	8,0	SynChropak AX300 (WAX)	NaCl	0,991	-21,2	-18,5	1,15
	6,5	Mono Q (SAX)	NaCl	0,997	-18,8	-9,8	1,92
Seroalbúmina humana	7,5	Mono Q (SAX)	NaCl	0,978	-20,1	-16,2	1,24
	9,6	Mono Q (SAX)	NaCl	0,990	-23,5	-34,8	0,68
	5,5	Mono Q (SAX)	NaCl	0,991	-11,7	-9,6	1,22
Ovoalbúmina	6,0	SynChropak Q 300 (SAX)	NaCl	0,999	-15,1	-13,1	1,15
	6,5	Mono Q (SAX)	NaCl	0,996	-17,5	-15,3	1,14
	7,0	SynChropak Q 300 (SAX)	NaCl	0,999	-16,6	-17,1	0,97
	7,5	Mono Q (SAX)	NaCl	0,982	-17,4	-18,0	0,97
	7,8	Zorbax Bio Series 300 (WAX)	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,998	-15,3	-18,0	0,81
	7,8	Zorbax Bio Series 300 (SAX)	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,999	-13,3	-18,8	0,71
	8,0	SynChropak Q 300 (SAX)	NaCl	0,999	-19,4	-19,3	1,01
	9,6	Mono Q (SAX)	NaCl	0,965	-19,9	-22,2	0,90
Lisozima	4,9	Resina no comercial (WCX)	Cat(OAc) ₂	0,999	+9,2	+10,6	0,87
	6,0	Zorbax Bio Series 300 (WCX)	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,998	+10,6	+9,0	1,18
	6,0	Zorbax Bio Series 300 (SCX)	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,999	+9,0	+9,0	1,00
	6,4	Zorbax Bio Series 300 (WCX)	NaOAc	0,994	+10,9	+8,6	1,27
	6,4	Zorbax Bio Series 300 (SCX)	NaOAc	0,997	+10,3	+8,6	1,20

Tabla 14.6. Condiciones cromatográficas y carga neta característica de proteínas, q_{chr} , obtenidas de experimentos cromatográficos, y de una comparación entre q_{chr} y q_{finu} . (a) SAX = intercambiador aniónico fuerte, WAX = Intercambiador aniónico débil, SCX = intercambiador catiónico fuerte, WCX = intercambiador catiónico débil. (b) Coeficientes de correlación para la linealidad del gráfico de k' versus $1/\sqrt{I}$.¹³ Reproducido, con permiso, de J. Ståhlberg, B. Jönsson, y C. Horváth, *Anal. Chem.* **63**, 1991, 1867-1874. "Theory for Electrostatic Interaction Chromatography of Proteins". © 1991 by American Chemical Society.

14.9 Lecturas sugeridas

- W.S. Hancock, Ed., “*High Performance Liquid Chromatography in Biotechnology*”, Wiley, New York, 1990.
- A. Fallon, R.F.G. Booth y L.D. Bell, “*Applications of HPLC in Biochemistry*”, Elsevier, New York, 1987.
- J.-C. Janson y L. Ryden, Eds., “*Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods and Applications*”, VCH Publishers, New York, 1989.
- P.R. Haddad y P.E. Jackson, “*Ion Chromatography: Principles and Applications*”, Elsevier, New York, 1987.
- S. Yamamoto, “*Ion-Exchange Chromatography of Proteins*”, Marcel Dekker, New York, 1988.
- I.M. Chaiken, “*Analytical Affinity Chromatography*”, CRC Press, Boca Raton, 1987.
- P.D. G. Dean, W.S. Johnson y F.A. Middle, “*Affinity Chromatography: A Practical Approach*”, Oxford University Press, Washington DC, 1985.
- D.J. Winzor, From gel filtration to biosensor technology: the development of chromatography for the characterization of protein interactions. Review en *J. Mol. Recognit.* **13**, 2000, 279-298.

14.10 Problemas

1. Una mezcla que consistía en dos componentes principales proteicos fue sometida a cromatografía de filtración en geles, utilizando como fase móvil una solución tampón de fosfatos 0,05 M, pH 7,1 y Sephadex G-100 como la fase estacionaria. Una especie que no sufre retención, azul de dextrano, es eluido en 2,6 minutos, mientras que las proteínas X e Y son eluidas a los 6,7 y 9,1 minutos, respectivamente.

- (a) Calcule la retención relativa, α , de los dos componentes proteicos.
- (b) ¿Cuál proteína tiene el peso molecular más elevado?

2. Una columna de filtración en geles utilizando biogel P-100 tenía un volumen muerto de 5,0 ml y un volumen de la fase estacionaria de 50,0 mL. La columna fue calibrada usando seis proteínas de peso molecular conocido, midiendo el volumen de elución de cada pico (Tabla 14.7). Luego, una proteína incógnita fue aplicada en la columna, y su volumen de elución fue medido. Dado los datos presentados en la Tabla más abajo, determine el peso molecular de la proteína incógnita.

Proteína	MW (kD)	Volumen de elución (mL)
Citocromo c	11,7	42,9
Mioglobina	17,2	37,8
Cadena liviana de IgG	23,5	33,9
Ovoalbúmina	43,0	26,1
Aconitasa	66,0	20,4
Transferrina	77,0	18,3
Incógnita	?	31,2

3. Describa un método por el cual una enzima deshidrogenasa se pueda purificar de una mezcla de proteínas (todas de similar peso molecular), de modo que solamente la enzima deshidrogenasa libre esté presente en la solución tampón final. (Dato: Utilice más de un paso cromatográfico).

4. Una nueva proteína con función de receptor ha sido aislada del tejido fino sensorial encontrado en los bigotes o barbas del pez gato de Luisiana (Louisiana blue catfish, un siluriforme). Los estudios han demostrado que esta proteína interactúa fuertemente con el glutamato. Una columna de afinidad fue preparada inmovilizando un dipéptido de ácido glutámico a través de su grupo amino N-terminal sobre celulosa activada con bromuro de cianógeno. El volumen muerto de la configuración final de la columna fue determinado, siendo 2,3 mL, midiendo el volumen de elución de un colorante que no sufre retención. Una serie de experimentos fueron realizados para determinar el volumen de elución de la proteína del receptor en función de la concentración de glutamato en la fase móvil. De los datos dados a continuación (Tabla 14.8), determine la constante de asociación para la reacción del glutamato con el receptor.

[Glutamato], μM	Volumen de elución, mL
0,1	52,3
0,2	35,6
0,3	27,3
0,4	22,3
0,5	19,0

CAPÍTULO 15

ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BIOMOLÉCULAS

15.1 Introducción

La espectrometría de masas se utiliza extensamente para el análisis cualitativo de muestras de composición desconocida, y en particular, para la identificación y la caracterización de macromoléculas biológicas. En décadas recientes se ha considerado la introducción y la optimización de los métodos de ionización llamados “suaves”, que pueden producir iones biomoleculares intactos en fase gaseosa, de tal manera de poder proceder a su separación y detección. Este Capítulo considera los fundamentos de la técnica e instrumentación de la espectrometría de masas (MS), los métodos de ionización, así como sus aplicaciones para el estudio de macromoléculas biológicas. Los espectrómetros de masas convencionales, usados para muestras volátiles con analitos de bajo peso molecular que se introducen en fase gas se llaman espectrómetros de masa de enfoque simple, y utilizan una fuente de iones de impacto de electrones.¹ La Figura 15.1 muestra un diagrama de este tipo de instrumento.

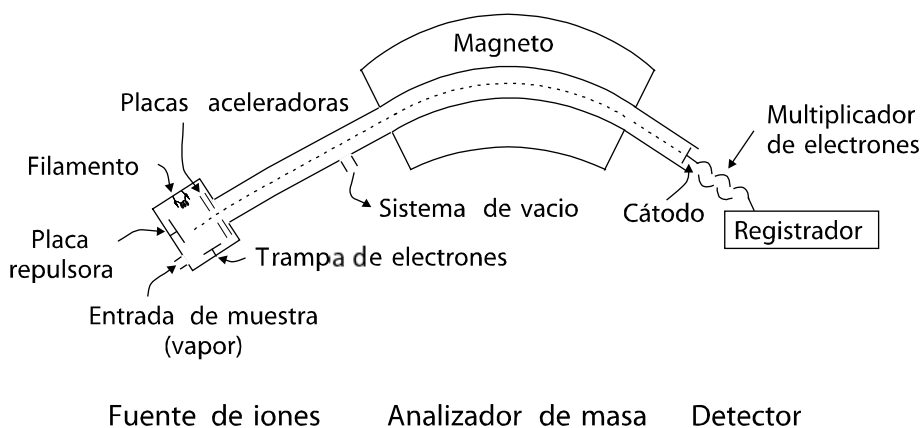
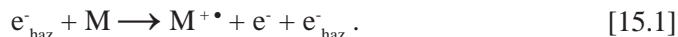


Figura 15.1. MS de enfoque simple con fuente de ionización de impacto de electrones.

1. R.A.W. Johnstone y M.E. Rose, “*Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists*”, Cambridge University Press, 1996, New York, pp. 34-41.

Con este tipo de MS, los iones son generados bombardeando la muestra en fase gas con un haz de electrones de alta energía. Estos electrones son emitidos por un alambre (filamento) caliente de tungsteno o de renio, y acelerados hacia una trampa de electrones que se mantiene a cerca de +70 V. El impacto de estos electrones con las moléculas de la muestra genera iones según la Eq. 15.1:



Los iones de la muestra generados en este proceso son impulsados mediante placas aceleradoras, que son placas sucesivas mantenidas a potenciales cada vez más negativos. El aumento en la energía cinética para las moléculas de la muestra que pasan a través de estas placas se relaciona con la carga del ión (z) y la diferencia del voltaje (V) a la que son sometidos los iones, según describe la Eq. 15.2:

$$\text{Energía cinética} = mv^2 / 2 = zeV , \quad [15.2]$$

donde v es la velocidad de un ión de masa m y número de cargas z , y e es la carga del electrón. Los iones entonces siguen una trayectoria de vuelo curvada mientras que pasan a través del analizador de masas, atravesando un sector de 60° o 90° de circunferencia. Cuando el ión pasa a través del sector magnético, su fuerza centrífuga ($= mv^2/r$, donde r es el radio del sector) y la fuerza magnética ($= Bzv$, donde B es la fuerza del campo magnético) son iguales. La fuerza centrífuga empuja el ión hacia una trayectoria recta, mientras que la fuerza magnética tira del ión hacia el centro del círculo.

El detector de iones observa el número de iones que colisionan con él en función de sus valores de m/z . La derivación que sigue muestra cómo los valores de m/z de los iones se relacionan con la fuerza del campo magnético, el radio del sector magnético y el voltaje de aceleración. Comenzamos igualando las fuerzas centrífugas y magnéticas:

$$mv^2/r = Bzev , \quad [15.3]$$

y reagrupando esta expresión se obtiene:

$$v^2 = (Bze/m)^2 ; \quad [15.4]$$

de la Eq. 15.02, se puede sustituir $v^2 = 2zeV/m$, para obtener:

$$2V = (Br)^2 ez/m , \quad [15.5]$$

y esta expresión rinde fácilmente la ecuación deseada para m/z :

$$m/z = (Br)^2 e/2V . \quad [15.6]$$

Por lo tanto, para determinados valores constantes de B , r y V , solamente los iones de un valor determinado en particular de m/z alcanzarán el detector de iones para generar una señal. Iones que son demasiado pesados (m/z demasiado grande) impactarán sobre la pared externa del sector magnético, mientras que iones más ligeros (m/z pequeño) tendrán radios pequeños de curvatura y colisionarán con la pared interna. Los espectrómetros de masa permiten variar en forma continua (escanear) los valores de B , o V (o ambos) para detectar los iones del interés a determinados valores de m/z .

La espectrometría de masa es una técnica bien establecida: J.J. Thompson diseñó el primer espectrómetro de masas en 1912. Los métodos para la producción de iones en estas épocas tempranas estaban limitados a muestras gaseosas (o a moléculas de baja presión del vapor), y eran utilizados con fines analíticos. Las moléculas orgánicas se fragmentan extensivamente al ser impactadas por electrones, pero las moléculas orgánicas pequeñas a menudo pueden ser identificadas a partir de sus patrones de fragmentación, más sencillos.

Los métodos de ionización denominados “suaves” fueron desarrollados durante las dos últimas décadas del siglo pasado, y permiten la formación de iones moleculares gaseosos de biomoléculas poliméricas grandes. Estos métodos permitieron que la MS fuera introducida al área de la bioquímica y la química biológica, y actualmente son particularmente útiles para el estudio de proteínas, glicoproteínas, ácidos nucleicos y de sus reacciones.

Con la instrumentación disponible actualmente los pesos moleculares de estas grandes biomoléculas pueden determinarse con gran precisión y exactitud. Las variaciones entre el MW determinado experimentalmente y el calculado (a partir de su código de DNA) es muy útil en la determinación de las modificaciones postranscripcionales de las cadenas polipeptídicas. Las interacciones no covalentes entre biomoléculas y sus ligandos también pueden ser estudiadas usando métodos suaves de ionización.

Del mismo modo, las técnicas de MS han sido utilizadas para analizar mutaciones y polimorfismos en secuencias de ácidos nucleicos, y para la identificación y caracterización química de células microbianas.

15.2 Descripción básica de la instrumentación

Según puede observarse en la Figura 15.1, hay tres componentes principales en cada espectrómetro de masas. La fuente de iones es utilizada para producir iones en fase gaseosa por captura o pérdida de electrones o de protones. En el analizador de masa, los iones se separan según sus cocientes m/z : los iones con un valor dado de m/z alcanzan el detector, y una señal de corriente es producida. Esta sección describe las fuentes suaves de ionización, los analizadores de masa y los detectores que son habitualmente utilizados en experimentos que utilizan macromoléculas biológicas.

15.2.1 Fuentes suaves de ionización

La fuente de iones utilizada para la generación de iones biomoleculares es crítica, y solo recientemente algunos métodos de ionización apropiados (suaves) han sido desarrollados.² Las fuentes de ionización de impacto de electrones son ubicadas en la categoría “dura”, dado que la muestra debe encontrarse originalmente en fase gas, y el proceso de ionización produce un número muy grande de fragmentos. Los métodos de ionización suaves fueron introducidos para superar los problemas asociados a la inestabilidad y a escasa volatibilidad (si alguna) de los analitos macromoleculares. La ionización por métodos suaves produce pocos fragmentos bajo condiciones relativamente poco agresivas. En la Tabla 15.1 se muestra una comparación entre los tres métodos suaves principales de ionización; algunos de los valores tabulados son fuertemente dependientes de las configuraciones individuales de cada espectrómetro de masa y de la resolución deseada.

	FAB	ESI	MALDI
Rango de masa, típicamente hasta	7000 Da ³ ; 25.000 Da ⁴	70.000 Da ³ ; 200.000 Da ⁴	300.000 Da ^{3,4}
Sensibilidad	Baja. Analito en el ámbito de nanomol	Alta. Analito en el ámbito pico-femtomol	Alta. Analito en el ámbito pico-femtomol
Fragmentación	Poca	Usualmente ninguna	Poca o ninguna
Señal de fondo (background)	Alta (matriz)	Muy baja	Alta (matriz)
No adecuado para	Especies que no fácilmente cargadas	Mezclas. Alta pureza requerida	Analitos fotosensibles (inestables)
Tipo de proceso	Batch	Continuo	Batch
La ionización procede	Continuamente	Continuamente	Pulsos cortos
Matriz	Si, en fase líquida, solventes no volátiles	Disolución acuosa	Si, fase sólida de estructura microcristalina

Tabla 15.1 Comparación de las fuentes de ionización blandas utilizadas en MS de moléculas biológicas.^{3,4}

2. G. Siuzdak, “*Mass Spectrometry for Biotechnology*”, Academic Press, New York, 1996, pp. 9-17.

3. G. Siuzdak, “*Mass Spectrometry for Biotechnology*”, Academic Press, New York, 1996, pp. 11-18.

4. R.A.W. Johnstone y M.E. Rose, “*Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists*”, Cambridge University Press, 1996, New York, pp. 34, 105-109.

15.2.1.1 Bombardeo rápido de átomos/iones (FAB).

Esta técnica de ionización utiliza un haz de gran energía (keV) compuesto por átomos de Xe, iones de Cs^+ o clusters (agrupaciones) de glicerol- NH_4^+ que impactan sobre la muestra y la matriz, arrancando moléculas y fragmentos que pueden ser ionizados y pasar a fase gas. Las matrices usadas comúnmente cuando el analito es un péptido son glicerol y el alcohol 3-nitrobencílico, que son poco volátiles, por lo que no sobrecargan las bombas de vacío. La muestra se disuelve en la matriz y se inserta en la cámara de ionización sobre una placa metálica. Cuando un haz de gran energía impacta la muestra (Figura 15.2), una fracción de su energía se transfiere, principalmente a las moléculas del solventes; de esta manera se evita una excesiva fragmentación del analito. Algunas moléculas del analito y de la matriz se desorben pasando a la fase gas, y si no se encontraran cargados, pueden adquirir carga en la fase de gas por reacción con los iones en fase gaseosa circundantes. Las moléculas cargadas son propulsadas electrostáticamente hacia el analizador de masas, y alcanzan eventualmente el detector. FAB fue el primer método blando de ionización, y fue introducido en 1981. Un año más tarde, moléculas tan grandes como la insulina humana fueron analizadas, y se convirtieron en una prueba patrón para determinar resolución y sensibilidad.⁵

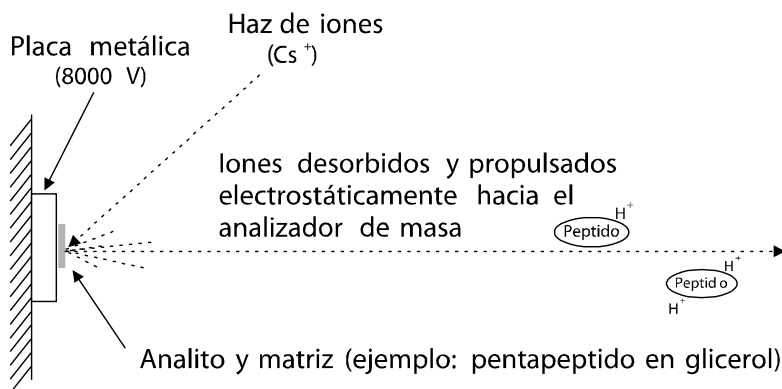


Figura 15.2. Fuente de la ionización FAB. El volumen total de la muestra y de la matriz es típicamente del orden del μL .

15.2.1.2 Ionización por electrospray (ESI).

El electrospray es un método especialmente suave de ionización, capaz de generar iones moleculares (sin fragmentación) a partir de macromoléculas biológicas presentes en disolución acuosa. Por esta razón ha recibido atención creciente en términos de su aplicabilidad al análisis de proteínas y DNA.

5. C.N. McEwen y B.S. Larsen in "Mass Spectrometry of Biological Materials", B.S. Larsen y C.N. McEwen Ed., Marcel Dekker, New York, 1998, pp.10-22.

La Figura 15.3 muestra un diagrama de esta fuente de ionización. Una aguja hueca de acero inoxidable se mantiene a unos pocos kilovoltios respecto a las paredes del compartimiento y al cátodo cilíndrico que la rodea. La muestra líquida entra a una velocidad de entre 1-20 $\mu\text{L}/\text{min}$ a través de la aguja, pero caudales más bajos (10-100 nL/min) están empezando a ser más comunes en los instrumentos modernos. El campo eléctrico en la extremidad de la aguja dispersa el líquido por fuerzas Coulombicas, en un fino aerosol de gotitas cargadas. Estas gotitas migran en el campo eléctrico hacia la entrada del capilar de vidrio. Un flujo del gas de secado (típicamente N_2 a 100 mL/s) evapora el solvente de las gotitas, de modo que su diámetro disminuye, y la densidad de carga superficial aumenta en cada gotita. Cuando esta densidad de carga superficial alcanza el límite de Rayleigh, la repulsión Coulombica es aproximadamente igual a la tensión superficial, y la gotita estalla en gotitas más pequeñas. Este proceso continúa hasta que el campo debido a la densidad de la carga superficial es bastante fuerte para ionizar a las macromoléculas, que entonces son propulsadas a través del separador (*skimmer*) y dentro del sector magnético. La mayoría de las macromoléculas biológicas que se ionizan de este modo presentan múltiples cargas.

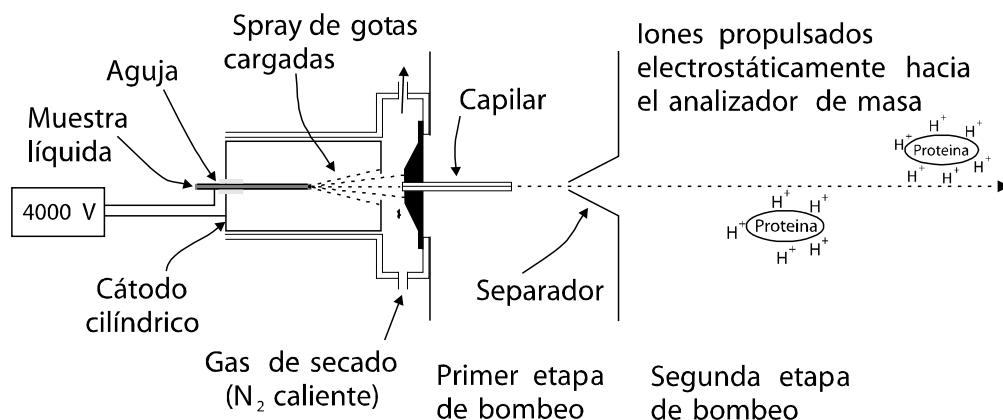


Figura 15.3. Fuente de ionización ESI.

15.2.1.3 Desorción/ionización de la matriz asistida por láser (MALDI).

En este método de ionización, el analito se combina con un compuesto que forma la matriz, en un cociente molar cercano a 1:1000, y se evapora sobre una placa metálica. El compuesto de la matriz se elige de modo tal que absorba fuertemente en la longitud de onda del láser usado. La absorción causa un aumento rápido de la temperatura, permitiendo la vaporización de la muestra sin que se fragmente extensivamente. Este proceso se presenta esquemáticamente en la Figura 15.4.

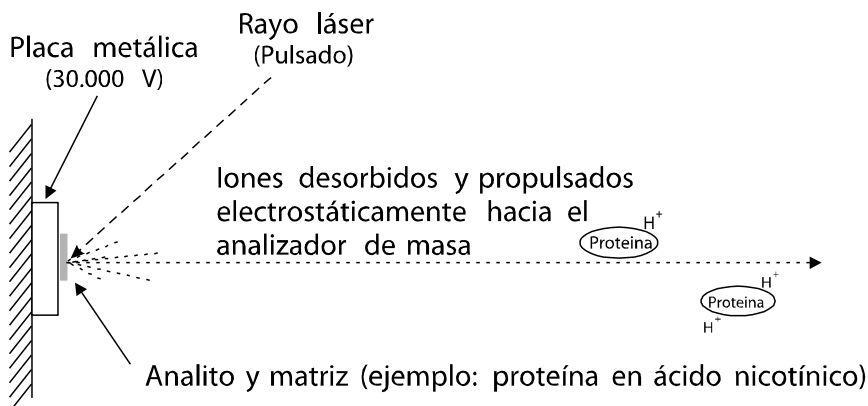


Figura 15.4. Fuente de ionización MALDI.

Se utilizan cortos pulsos de radiación láser, típicamente a 337 nm (láser del nitrógeno), aunque también pueden emplearse láseres UV o IR, dependiendo del compuesto seleccionado como matriz. Algunos compuestos utilizados habitualmente como matriz son el ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido nicotínico, ácido sinapínico (*sinapinic acid*, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico), y ácido α -cianocaboxílico.⁶

15.2.2 Analizadores de masa^{7,8}

Diversos principios físicos son utilizados para analizar los iones producidos por la fuente de la ionización, y uno o más sistemas analizadores de masa pueden ser utilizados en tándem en un dado instrumento. Una breve descripción de los analizadores de masa principales será presentada aquí. Los valores detallados para la resolución de estos analizadores indican su capacidad de distinguir iones muy cercanos en sus valores de m/z , según la Ecuación 15.7:

$$\text{Resolución} = \frac{M}{\Delta m}, \quad [15.7]$$

donde M es masa experimental medida del pico del interés (Da), y el Δm (Da) es el valor es la separación de masas entre los máximos de dos picos cercanos (simétricos), según se observa en la Figura 15.5. Se utiliza generalmente la definición del valle del 10% para establecer si un pico está separado de otro (Figura 15.5); usando esta definición se considera que dos

6. C.N. McEwen y B.S. Larsen in "Mass Spectrometry of Biological Materials", B.S. Larsen and C.N. McEwen Ed., Marcel Dekker, New York, 1998, pp.17-19.

7. G. Siuzdak, "Mass Spectrometry for Biotechnology", Academic Press, New York, 1996, pp. 35-41.

8. R.A.W. Johnstone y M.E. Rose, *Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists*, Cambridge University Press, 1996, New York, pp 37, 54.

picos están separados si se unen a una intensidad máxima del 10% de la altura máxima de los picos. Un criterio análogo es la definición del valle del 50%; utilizando esta definición, la resolución calculada para un dado grupo de datos es nominalmente más alta.

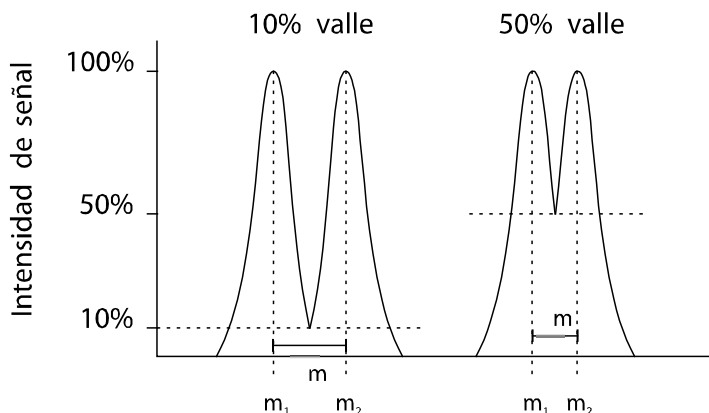


Figura 15.5. La resolución se puede calcular empleando diversas definiciones. La más rigurosa de éstas es la definición de valle de 10%, que es la más común en MS de sector magnético.

Una resolución de $R=1000$ significa que el espectrómetro de masas puede separar un ión en m/z 10.000 de otro en 10.010. Si la resolución es baja, dos o más picos pueden aparecer fusionados en solo uno.

Alternativamente, un pico simétrico aislado puede ser utilizado para estimar R . En este caso, el Δm puede ser definido como el ancho del pico al 5%, o al 50% de la altura máxima, este último es denominada generalmente como FWHM (ancho máximo a media altura, *full width at half maximum*) según puede observarse en la Figura 15.6.

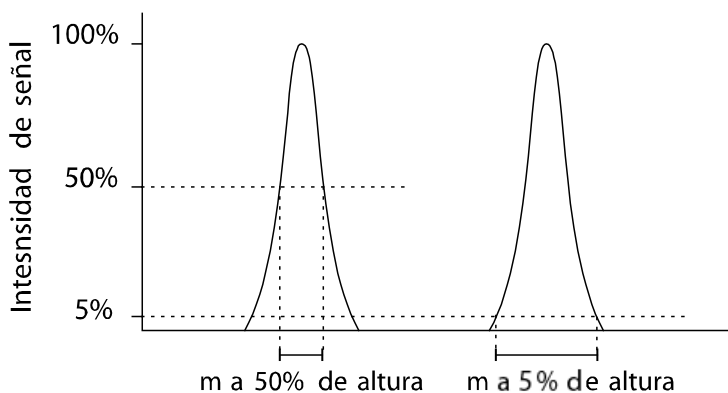


Figura 15.6. Estimación de la resolución utilizando un pico aislado.

En espectrómetros basados en cuadrupolos o trampas iónicas, es de uso habitual utilizar la definición de resolución denominada *resolución unitaria (unit resolution)*; esta significa

que cada masa puede ser separada de la siguiente masa en números enteros (500 puede ser diferenciada de 501, 2000 de 2001, etc.). La comparación y la conversión entre las diversas definiciones de resolución no es trivial, considerando que son fuertemente dependientes en la forma de los picos obtenidos (gaussiano, triangular, trapezoidal, lorentziano, o otros).⁹

La resolución también se utiliza para comparar los valores de masa teóricos (calculados o predecidos) con respecto al valor de masa experimentalmente determinado. La resolución define la anchura de los picos, y con ellos los valores de error en partes por millón (ppm) pueden ser calculados mediante la Eq. 15.8; esto permite la valoración de la precisión cuando un valor de masa es asignado experimentalmente:

$$\text{ppm} = \frac{10^6}{R} = \frac{10^6 \Delta m}{M} \quad [15.8]$$

En la Tabla 15.2, algunos ejemplos de la relación entre estas figuras de mérito utilizadas en espectrometría de masas son detalladas.¹⁰

m/z	Δm	Resolución	\pm ppm	Rango de masa (Da)
2.000	5	400	2.500	1.995-2.005
2.000	0,5	4.000	250	1.999,5-2.000,5
2.000	0,05	40.000	25	1.999,95-2.000,05
20.000	5	4.000	250	19.995-20.005
20.000	0,5	40.000	25	19.999,5-20.000,5
20.000	0,05	400.000	2,5	19.999,95-20.000,05
200.000 5		40.000	25	199.995-200.005
200.000 0,5		400.000	2,5	199.999,5-200.000,5
200.000 0,05		4.000.000	0,25	199.999,95-200.000,05

Tabla 15.2. Resolución como $R=M/\Delta m$ y su efecto sobre la precisión en espectrometría de masas.

La base de la separación utilizando el *sector magnético* fue explicada en las primeras páginas de este Capítulo; el campo magnético es explorado (escaneado) generalmente desde campos bajos a altos, por lo tanto a los iones con baja relación m/z alcanzarán el detector al principio de la exploración.

Un *analizador electrostático* esta formado por dos placas curvadas con campos eléctricos opuestos que atraen y rechazan los iones. Cada ión sigue cierta trayectoria que depende de su momento; iones con bajo momento viajan una trayectoria corta cuando se los compara con iones con más alto momento, produciendo así un efecto de enfoque. Este tipo de analizador

9. S.L. Mullen y A.G. Maeshall, *Anal. Chim. Acta* **178**, 1985, 17-26.

10. A.P. Snyder, "Interpreting Protein Mass Spectra", Oxford University Press, Oxford, 2000, pp. 87-110.

de masas se utiliza generalmente asociado a un sector magnético, de manera de aumentar la resolución final del instrumento.

El *analizador de cuadrupolo* (o *filtro de masas*) esta formado por cuatro barras metálicas (generalmente acero de alto grado), colocadas exactamente en cada esquina de un cuadrado imaginario. Entre las barras diagonalmente opuestas se aplica un voltaje de corriente continua (cc), con un campo alterno de radiofrecuencia (rf) sobrepuesto. Se exploran los voltajes de cc y de rf. La trayectoria de un ión a través del cuadrupolo es complicada. Bajo condiciones dadas de cc y de rf, solamente los iones que poseen determinado m/z alcanzarán el detector. El resto de los iones con distintos valores de m/z poseen trayectorias inestables, por lo que impactan sobre las barras metálicas.

Los *analizadores de tiempo de vuelo* (TOF) permiten que los iones se muevan a través de un tubo de vacío (generalmente llamado *tubo de vuelo*). Los iones son producidos generalmente por MALDI o por otra técnica capaz de producir pulsos discretos de iones. Después de unos 100-500 ns de emitido el pulso láser, un fuerte campo de aceleración es encendido, y éste imparte una energía cinética fija a los iones. Mientras que los iones viajan a través del tubo de vacío, los iones con una relación m/z baja viajarán más rápidamente y llegarán al detector en primer lugar.¹¹ La resolución de los instrumentos MS del tipo MALDI-TOF es baja (generalmente menos de 500) pero el rango de masa que poseen es prácticamente ilimitado. Para aumentar la resolución, se han introducido los instrumentos de tipo TOF-reflectrón. El reflectrón es un espejo electrostático usado para corregir para la distribución de la energía cinética inicial impartida a los iones (dado que los iones no entran en el tubo de vuelo exactamente al mismo tiempo); es por lo tanto posible alcanzar una resolución más alta (Tabla 15.3) en los equipos basados en TOF-reflectrón.

Característica	Sector magnético	Cuádrupolo	QIT	TOF-reflectrón	FTICR
Rango de masa, hasta (Da)	15.000	4000	100.000	Sin límite	$> 10^6$
Resolución	200.000	Unitaria	30.000	15.000	$> 10^6$

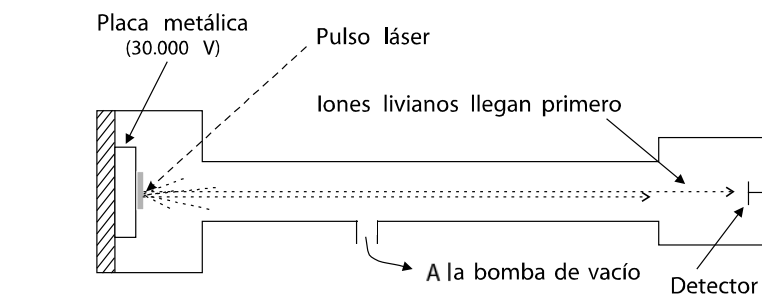
Tabla 15.3. Comparación entre diferentes analizadores de masa.¹²

Los *instrumentos de MS/MS* poseen una combinación de dos o más analizadores de masa en tándem. Una variedad de diversidad de configuraciones han sido construidas, usando uno o varios analizadores de masa, cuadrupolos, magnéticos y electrostáticos. Un analizador de masas de cuadrupolo triple se compone de dos cuadrupolos de exploración separados por un cuadrupolo que aplica solo rf, donde un gas choca con los iones del analito para producir

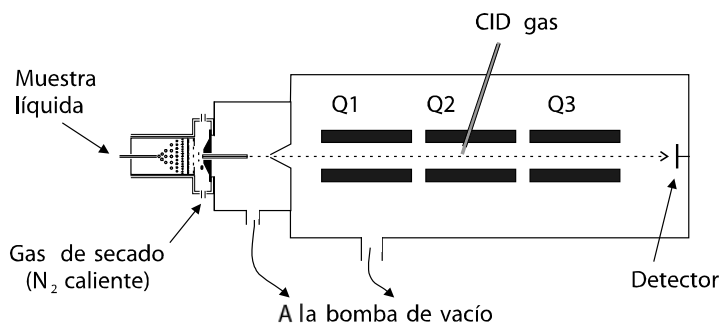
11. M. Mann, R.C. Hendrickson y A. Pandey. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 2001, 437-473.

12. C. Dass, "Principles and Practice of Biological Mass Spectrometry" Wiley-Interscience, New York, 2001, pp. 83-84.

la fragmentación (CID, disociación inducida por colisión). La Figura 15.7 muestra dos combinaciones comunes de fuente de ionización y de analizador de masa.



MALDI-TOF



ESI-Triple cuadrupolo

Figura 15.7. Configuraciones típicas usadas en espectrometría de masas de biomoléculas. En MALDI-TOF, los iones producidos por un corto pulso láser viajan a través de un tubo de vuelo, llegando a diferentes tiempos al detector. En ESI-Triple cuadrupolo, el primer cuadrupolo (Q1) se utiliza para separar los iones en el spray, en el segundo (Q2, también llamado celda de fragmentación) los átomos de argón chocan con los iones; los iones que resultan (“iones hijos”) se analizan en el Q3, y son posteriormente detectados.

Entre los analizadores de masa relativamente nuevos y con muy de alta resolución se incluyen los cuadrupolos de trampa de iones (QIT) y los instrumentos de resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FTICR). En ambos analizadores, los iones se atrapan en un campo tridimensional, y se analizan luego de atrapados. En la Tabla 15.3 los analizadores de masa descritos aquí son comparados. La combinación del MS con otras técnicas analíticas es también muy común; la utilización de espectrómetros de masa como detectores en diversos métodos cromatográficos instrumentales es una aplicación típica y de gran utilidad analítica.

15.2.3 Detectores

Los iones separados por el analizador de masas se detectan y amplifican dando lugar a una señal de corriente; esto se logra generalmente usando un multiplicador de electrones o un contador de centelleo.

Un multiplicador de electrones consiste en una serie de dínodos mantenidos a potenciales crecientes; los iones llegan al primer dínodo, produciendo una emisión de electrones secundarios. Estos se aceleran en el campo eléctrico e impactan en un segundo dínodo, produciendo la liberación de más electrones. Los dínodos sucesivos continúan amplificando la corriente, pudiendo obtenerse una amplificación total muy alta; valores de 10^6 se obtienen normalmente. La operación y el diseño de estos transductores son muy similares a un tubo fotomultiplicador, pero no se encuentra dentro de un tubo de cristal o cuarzo; por esta razón la contaminación es importante, principalmente en el primer dínodo; por ello el tiempo de vida útil de un multiplicador de electrones es relativamente corto.

En el contador del centelleo, los iones golpean un dínodo, desde el que se emiten electrones. Estos electrones impactan en una pantalla revestida de fósforo, causando la emisión de luz, que es detectada por un tubo fotomultiplicador.

15.3 Interpretación de los espectros de masa

La espectrometría de masa de alta resolución de compuestos de bajo peso molecular resulta en una serie de picos isotópicos para el ión paterno y para cada fragmento detectable. La intensidad de cada pico en la serie depende de la abundancia relativa de un isótopo dado así como el número de átomos de una identidad dada en el fragmento detectado. Por ejemplo, un espectro de masas del CO_2 muestra dos picos principales que corresponden a $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ y a $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ (siendo el pico correspondiente a $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ de aproximadamente el 1,1% de la intensidad del anterior) así como un número de picos menos intensos que resultan de otras combinaciones isotópicas. La Tabla 15.4 muestra los isótopos principales de varios elementos así como sus abundancias relativas; de estos datos, está claro que se espera que los iones moleculares o los fragmentarios que contienen átomos de C y S produzcan picos isotópicos con intensidades significativas.

La resolución del espectrómetro de masas, R , y la carga del ión detectado, z , son los factores más importantes que determinan si los picos isotópicos individuales serán observados en un valor dado de m/z . Cuando se emplea baja resolución, estas especies individuales contribuyen al denominado “pico envolvente”, según se observa en la Figura 15.8. En esta Figura se nota que la posición del pico envolvente está desplazada con respecto al del isótopo más abundante; este desplazamiento es predecible basándose en las abundancias isotópicas naturales de los elementos que componen la sustancia.

Isótopo	Masa, Da	Abundancia (%)
^{12}C	12,0000	98,89
^{13}C	13,003354	1,11
^1H	1,007825	99,986
^2H	2,014102	0,015
^{14}N	14,003074	99,63
^{15}N	15,000109	0,37
^{16}O	15,994915	99,762
^{17}O	16,999131	0,038
^{18}O	17,999160	0,200
^{32}S	31,972071	95,02
^{33}S	32,971457	0,75
^{34}S	33,967867	4,21
^{36}S	35,967081	0,02
^{31}P	30,973762	100

Tabla 15.4. Abundancias isotópicas de algunos elementos seleccionados.

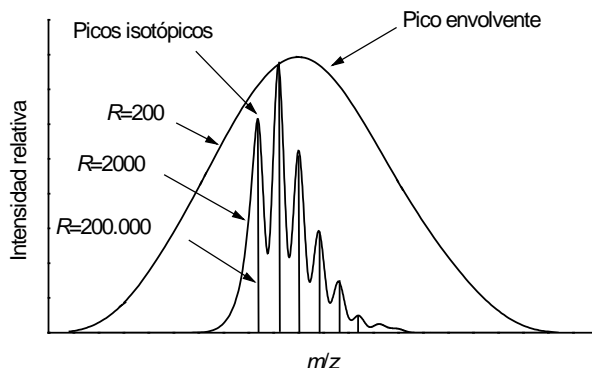


Figura 15.8. Espectros de masa para un péptido de masa nominal igual a 2537. Observe que con una resolución de 2000 ($R = 2000$) 6 picos isotópicos pueden ser observados claramente. La figura representa los espectros para un único ión molecular, por ejemplo $(\text{M}+\text{H})^+$, una molécula protonada sin fragmentación.

La masa de una especie química dada puede ser calculada de tres modos. El más simple de éstos utiliza el valor numérico en números enteros, de la masa del isótopo más abundante de cada elemento, lo que resulta en la *masa nominal* de la especie; este valor no es particularmente útil en espectrometría de masas. La *masa monoisotópica*, calculada usando la masa exacta del isótopo más abundante de cada elemento, es más útil, especialmente para la espectrometría de masas de alta resolución de especies de bajo peso molecular. Para las biomoléculas y sus iones fragmentarios, el valor más útil es la *masa promedio*. La masa

promedio se calcula promediando los pesos atómicos de todos los isótopos de cada elemento; este valor permite que la posición del pico envolvente sea predecida.¹³

La Tabla 15.5 muestra ejemplos de valores de masa nominal, monoisotópica y promedio. Aunque las diferencias entre los valores nominales y promedio pueden parecer pequeñas, especialmente para especies elementales, llegan a ser más grandes cuando la complejidad molecular aumenta y son importantes en establecer la identidad de una dada proteína. En particular, la mutagénesis sitio-dirigida y los estudios de modificaciones post-traduccionales requieren valores de masa promedio exactos para confirmar las identidades de las proteínas producidas.

Elemento o molécula	Masa nominal	Masa monoisotópica	Masa promedio
Carbono	12	12,0000	12,0111
Hidrógeno	1	1,0078	1,0080
Nitrógeno	14	14,0031	14,0067
Oxígeno	16	15,9949	15,9994
Azufre	32	31,9721	32,0660
Fósforo	31	30,9738	30,9738
Tripéptido C ₂₇ H ₂₉ N ₃ O ₇	507	507,1998	507,5476
Insulina porcina C ₂₅₆ H ₃₈₁ N ₆₅ O ₇₆ S ₆	5771	5773,6083	5777,6755

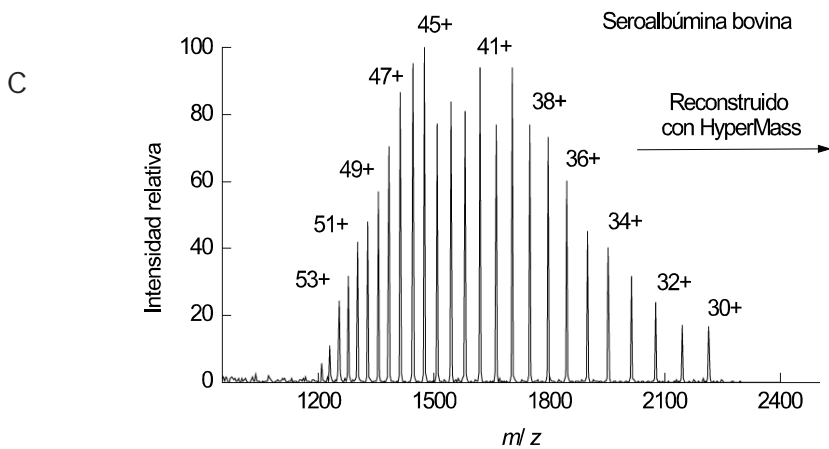
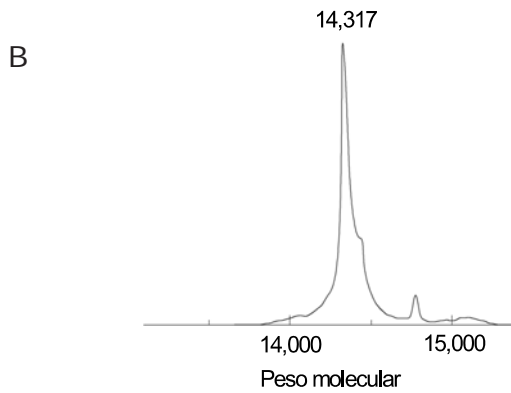
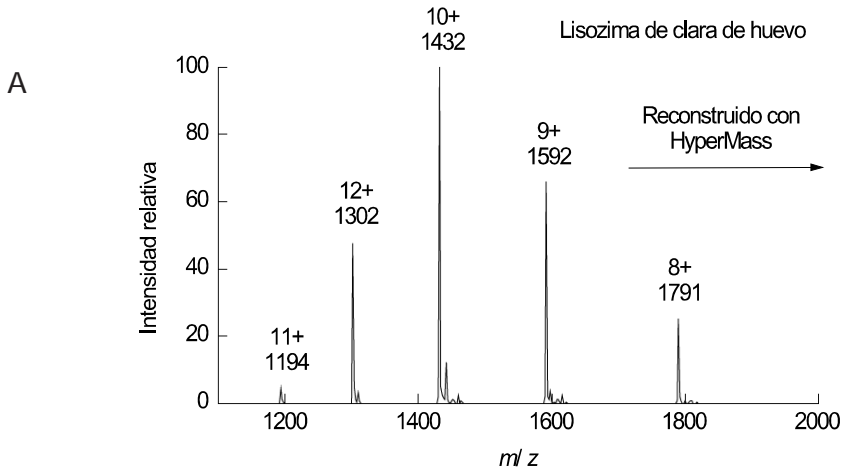
Tabla 15.5. Masa nominal, monoisotópica y promedio para algunos elementos y moléculas, en daltons (Da).

Para muestras purificadas de moléculas pequeñas estudiadas en espectrómetros de masa de baja resolución, y para las moléculas más grandes con una única carga, los iones fragmentarios son identificados fácilmente por cálculos directos usando los valores de masa promedio. La presencia o ausencia de fragmentos observables (incluyendo los iones paternos) se sabe que depende fuertemente del tipo de fuente de iones utilizada (por ejemplo, fuentes duras versus blandas) así como de variables en la fuente de ionización (tales como el voltaje de ionización y el de aceleración).

Biomoléculas tales como proteínas y oligonucleótidos presentan espectros de masa que son complicados por la presencia de familias de iones con múltiples cargas. La especie paterna, por ejemplo, generada por un método suave de ionización tal como FAB o ESI, rendirá varios picos m/z en los que m es igual a una constante más (proteína) o menos (ácido nucleico) un número variable de masas protónicas, mientras que z es una variable. La lisozima de clara de huevo, por ejemplo, produce espectros de ESI-masa con picos finos producidos por iones paternos a valores de m/z de entre 1791 y 1194; los valores correspondientes de z son de 8 a 12 (véase la Figura 15.9A). Analitos más grandes con más sitios de protonación/deprotonación rinden familias más grandes de picos para cada fragmento, y la superposición de

13. G. Siuzdak, "Mass Spectrometry for Biotechnology", Academic Press, New York, 1996, pp. 66-68.

los rangos de m/z para diversas familias de fragmentos puede complicar aún más los espectros de las biomoléculas. Por esta razón, los métodos suaves de ionización, que producen pocos fragmentos, son particularmente útiles para la espectrometría de masas de biomoléculas.



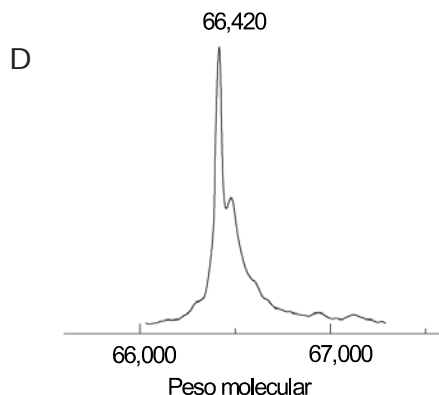


Figura 15.9. Espectros ESI-MS típicos para proteínas. Lisozima de clara de huevo y albúmina de suero bovino (BSA) se presentan como ejemplos, mostrando los resultados obtenidos por un algoritmo que calcula el MW, (HyperMass reconstruct).¹⁶ Reproducido, con permiso, de Gary Siuzdak, “*Mass Spectrometry for Biotechnology*”, Academic Press, 1996. Copyright © 1996 by Academic Press, Inc.

La exactitud en espectrometría de masa depende de la calibración del eje de m/z de los espectros obtenidos. La calibración se realiza típicamente utilizando muestras o soluciones separadas de la sustancia utilizada como calibrador (o patrón), bajo condiciones instrumentales idénticas a las del analito. Se pueden seleccionar distintas sustancias como patrones de calibración, dependiendo de la técnica de ionización y el rango de m/z requeridos para el analito; los patrones típicos usados para los métodos suaves de ionización incluyen fragmentos de tripsina bovina, insulina bovina (5734 Da), citocromo *c* (12.361 Da), mioglobina de caballo (16.951 Da), lisozima (14.317 Da) y propilenglicol. Soluciones del analito preparada en ausencia y presencia de una especie patrón también pueden ser utilizadas. La Tabla 15.6 muestra algunos valores de picos típicos de calibración obtenidos utilizando fragmentos originados por autólisis de tripsina bovina.¹⁴

Secuencia aminoacídica, desde-a	Masa (Da)		Secuencia
	Monoisotópica	Promedio	
110-111	259,19	259,35	LK
157-159	362,20	362,49	CLK
238-243	623,31	632,67	QTIASN
221-228	905,50	906,05	NKPGVYTK
146-156	1152,57	1153,25	SSGTSYPDVLLK
70-89	2162,05	2163,33	LGEDNINVVEGNEQFISASK
21-63	4550,12	4553,14	IVGGYTCSGA...VVSAAHCYK

Tabla 15.6. Fragmentos obtenidos por autólisis de tripsina bovina, usados para la calibración en m/z .

14. G. Siuzdak, “*Mass Spectrometry for Biotechnology*”, Academic Press, New York, 1996, pp. 22-24.

15.4 Determinación del peso molecular de biomoléculas

ESI es la fuente de ionización más comúnmente utilizada para los estudios biomoleculares. En este proceso de ionización, iones con múltiples cargas son formados (sin fragmentación), y esto tiene dos consecuencias importantes. En primer lugar, las moléculas grandes pueden ser detectadas utilizando instrumentos de MS con un rango de masas bajo; por ejemplo, un ión de masa 10,000 Da con 1 protón sería detectado en $m/z \approx 10,001$ mientras que el mismo ión con 9 protones adicionales será detectado en una posición muy distinta de m/z (≈ 1001). En segundo lugar, la multiplicidad de picos permite la valoración del peso molecular como promedio de estos picos múltiples, mediante el uso de algoritmos de cómputo *ad-hoc*, mejorando la precisión del resultado de MW.

Diferentes algoritmos, normalmente incorporados en el software de los equipos, son utilizados para calcular el MW. Los algoritmos se basan en los siguientes cálculos y simplificaciones. Si dos picos adyacentes en el espectro (p_1 y p_2), son de la misma biomolécula, y se diferencian solamente por la adición de un único protón, podemos escribir las Ecuaciones siguientes:¹⁵

$$m_1 = (M + nH)/n \quad \text{y} \quad m_2 = (M + \{n+1\}H)/n+1, \quad [15.9]$$

donde m_1 y m_2 son los valores de m/z para los picos p_1 y p_2 respectivamente, M es el valor experimental deseado de MW, n es el número de cargas y H es la masa del protón; $m_2 < m_1$.

Usando dos picos contiguos, la masa molecular de un biopolímero puede ser calculada resolviendo las dos ecuaciones siguientes:

$$n_2 = \frac{m_2 - H}{m_1 - m_2}, \quad [15.10]$$

$$M = n(m_1 - H), \quad [15.11]$$

Estas ecuaciones utilizan solo dos picos; los algoritmos de computadora utilizan todos los picos identificados para obtener valores más exactos del MW. El número y la abundancia relativa de diversos iones moleculares dependen del medio en que se encuentra la proteína (solución tampón, concentración salina) y de los parámetros instrumentales (es decir voltaje, vacío y otros). Los resultados típicos de la determinación del MW se muestran en la Figura 15.9.

Los iones moleculares que poseen múltiples cargas, según se observo en la Figura 15.9, permiten el cálculo exacto del peso molecular, siempre y cuando los estados de carga de los iones moleculares sean conocidos. Los espectrómetros de masa de alta resolución permiten que los estados de la carga sean determinados a partir de los picos isotópicos para un ión molecular dado. Los picos que corresponden a los iones moleculares presentados en la Figura 15.9

15. C. Dass, "Principles and Practice of Biological Mass Spectrometry", Wiley-Interscience, New York, 2001, pp. 125-128.

están formados por la fusión de diversos picos isotópicos. Si el pico molecular del ión tiene un estado de carga de +1, $(M+H)^+$, las diferencias en masa entre los picos isotópicos deben ser de 1 dalton; de igual manera, en el estado de carga +2, $(M+2H)^{2+}$, las diferencias deben ser 0,5 Da. Puede observarse en la Figura 15.10, que una resolución creciente es necesaria para observar picos isotópicos cuando el estado de carga del ión molecular aumenta; la resolución proporcionada por muchos de los instrumentos disponibles en el mercado solo permite la observación de picos isotópicos moleculares en iones moleculares con una, dos o tres cargas.

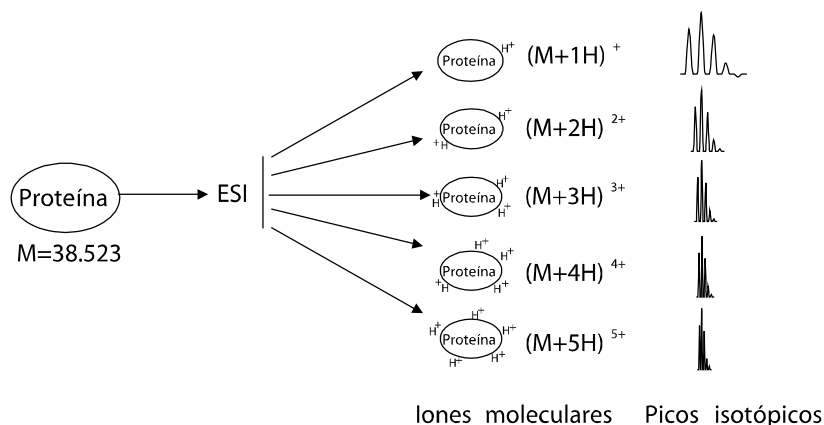


Figura 15.10. Formación de moléculas proteicas con múltiples cargas utilizando ionización por ESI. Para los cálculos de masa y de m/z , vea la Tabla 15.8.

Los picos isotópicos observados para las proteínas son producidos principalmente por la diferencia de masas entre el ^{12}C y el ^{13}C , de aproximadamente 1 unidad de masa. Una vez que se determina un estado de carga de un ión molecular, los otros estados de la carga son asignados fácilmente por observación espectral. ESI, MALDI y FAB se utilizan generalmente en el modo “ión-positivo”, especialmente para la determinación de MW de proteínas; por lo tanto la masa del protón se debe utilizar para calcular la masa del ión, de acuerdo a lo presentado en la Tabla 15.7.

Masa proteica (M_r)	Número de cargas	Masa del ión molecular	m/z	Distancia (m/z) entre picos isotópicos
38.523,5	1	38.524,5	38.524,5	1
	2	38.525,5	19.262,8	0,5
	3	38.526,5	12.842,2	0,33
	4	38.527,5	9.631,88	0,25
	5	38.528,5	7.705,7	0,2
	10	38.533,5	3.853,4	0,1

Tabla 15.7. Relación calculada entre la masa del ión molecular y los valores de m/z para iones moleculares con múltiples cargas (protonados).

15.5 Identificación de proteínas

La masa molecular de las proteínas es una información escasa para su identificación, pero es adecuada para la confirmación de identidad; por ello MS es una de las técnicas preferidas para la caracterización y el control de calidad de proteínas recombinantes y de otras biomoléculas. De la misma manera, se ha utilizado para estudiar modificaciones post-traduccionales (como la glicosilación y la formación de uniones disulfuro), y otros procesos que pueden modificar la masa de la proteína.¹⁶

Con el objetivo de identificación se han utilizado dos acercamientos básicos. En el primero, una proteína purificada se digiere enzimáticamente, la mezcla del péptido y del producto de la digestión son analizados, obteniéndose el patrón de masas de esta disolución. Este patrón, también llamado “huella digital por MS” (“*MS fingerprint*”), se utiliza para buscar en bases de datos de proteínas disponibles en Internet o en bancos de datos de DNA.¹⁷ Información sobre el origen de la proteína y una estimación de su MW se requieren para mejorar las posibilidades de asociarla correctamente. El algoritmo de búsqueda entonces “digiere” teóricamente todas las proteínas apropiadas en la base de datos con la enzima especificada, y aparea las masas teóricas y experimentales. Se alinean las mejores parejas, y un parámetro de confianza indicativo de la bondad de este apareamiento es generalmente calculado.¹⁸

El segundo acercamiento utiliza “etiquetas” de la secuencia del péptido (*sequence tags*) para identificar el péptido, y por lo tanto la proteína. Este método se basa en la presunción que en un espectro MS/MS de un péptido algunos residuos consecutivos aminoácidos pueden generalmente ser identificados claramente. En un protocolo típico, los péptidos obtenidos de una digestión trípica de la proteína se ionizan mediante ESI, y son separados por su masa (primer cuadrupolo); algunos péptidos seleccionados son fragmentados mediante CID, y los fragmentos son analizados para determinar su masa (Figura 15.11). La secuencia resuelta o determinada del aminoácido puede ser muy pequeña (dos residuos), pero considerando la selectividad de la reacción enzimática (puntos específicos de corte en la proteína o péptido) y que los valores de MW de los péptidos son conocidos, la probabilidad de formar parejas al azar es generalmente baja, por ejemplo del orden del 3% para una situación hipotética donde se conocen solo dos residuos aminoácidos.¹⁹ En este ejemplo, los datos presentados en la Tabla 15.8 se utilizan para producir una secuencia de búsqueda para el programa, y se introducen en una base de datos.

16. G. Siuzdak, “*Mass Spectrometry for Biotechnology*”, Academic Press, New York, 1996, p. 90.

17. Por ejemplo ver <http://pepsea.protana.com/> o <http://www.proteometrics.com/> o <http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound>.

18. W.J. Griffiths, A.P. Jonsson, S. Liu, D.K. Rai y Y. Wang, *Biochem. J.* **355**, 2001, 545-561.

19. M. Mann y M. Wilm, *Anal. Chem.* **66**, 1994, 4390-4399.

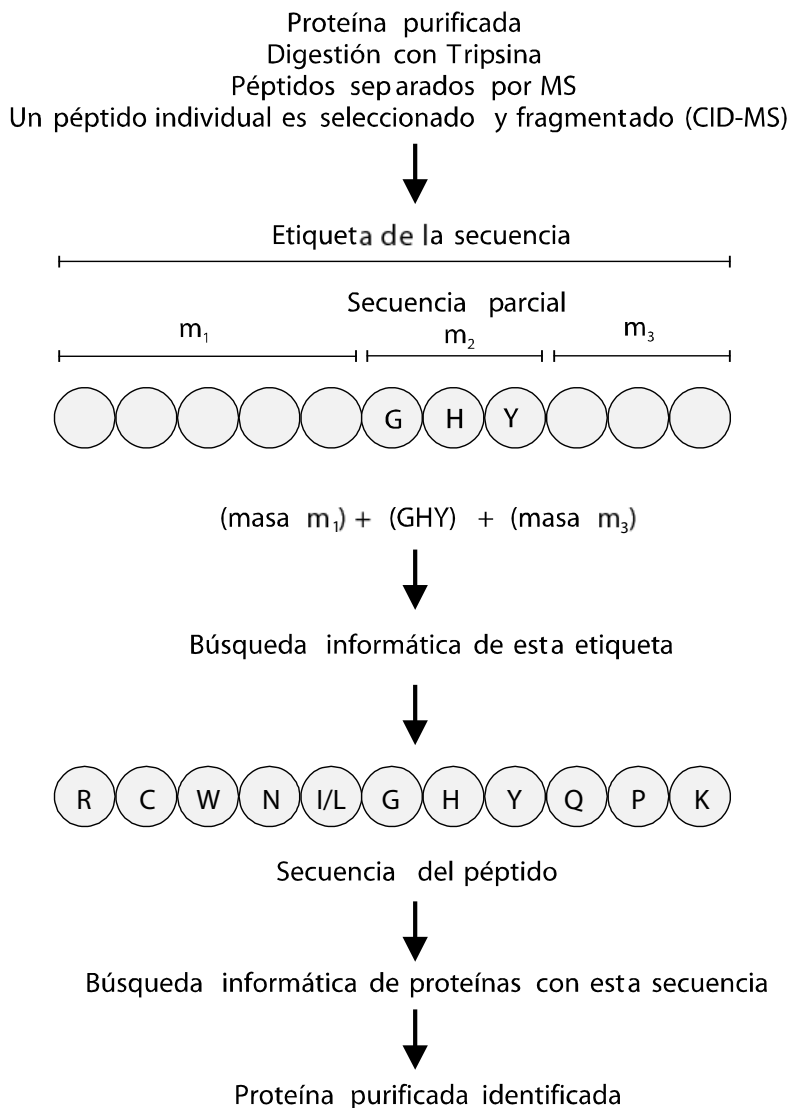


Figura 15.11. Secuenciación de un péptido utilizando el método de etiquetado de secuencia, con posterior identificación de la proteína originaria.

La Figura 15.11 también muestra un esquema para del procedimiento basado en el método de etiqueta de secuencia; en este esquema la definición usada es que $m_1 + m_2 + m_3 = M$, donde M es la masa del péptido. Los programas de computadora que utilizan algoritmos diseñados para buscar con este procedimiento de etiqueta de secuencia son accesibles en Internet.²⁰

20. Por ejemplo ver <http://www.mann.embl-heidelberg.de/Services/PeptideSearchIntro.html>.

Criterio de correspondencia	
Especificidad enzimática	Tripsina
Masa molecular medida del péptido	2111 ± 0,4
Corrida de iones de secuencia	977,4; 1074,5; 1161,5
Tipo de serie iónica	serie b (ver Fig. 15.13)
Secuencia parcial	PS
Masa de la región 1 (m_1)	977,4
Masa de la región 3 (m_3)	949,5
Cadena de búsqueda (search string)	(977,4)PS(949,5)

Tabla 15.8. Datos utilizados para realizar una búsqueda de la secuencia de un péptido usando el método del etiquetado de secuencia. Las masas son monoisotópicas y en daltons. La diferencia de masas entre los picos a 997,4 y 1074,5 corresponde a la masa de un residuo de prolina.

Obviamente, un cierto conocimiento de la secuencia de la proteína (o de la secuencia del gen) es necesario para utilizar este método de identificación de proteínas. Por lo tanto, la probabilidad de asociar correctamente una proteína analito con su secuencia es más alta cuando la proteína que se identificará proviene de un organismo cuyo genoma ha sido totalmente secuenciado, tales como *E. coli*, *B. subtilis* u *H. sapiens*.

15.6 Secuenciación de péptidos y proteínas

Hay varias configuraciones instrumentales que pueden ser utilizadas para obtener información acerca de la secuencia de proteínas y péptidos. El ESI-triple-cuadrupolo se utiliza con frecuencia; esta configuración produce un número razonable de fragmentos, la resolución es generalmente suficiente y el equipo es relativamente económico. Con esta configuración de MS/MS, péptidos de hasta 2500 Da pueden ser analizados. Equipos MALDI con analizadores de masa TOF-reflectrón e instrumentos de resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier están también comenzando a ser utilizados.²¹

Un procedimiento típico para secuenciar una proteína comienza por la digestión con una proteasa tal como tripsina, para obtener una colección de péptidos trípticos. Otras enzimas así como sus sitios de corte son descriptos en la literatura.²² Esta colección de péptidos puede ser ionizada utilizando ESI, separada por el primer cuadrupolo según sus cocientes m/z , y después fragmentada (CID), siendo los fragmentos resultantes analizados en el tercer cuadrupolo. El espectro de masas se puede analizar para establecer la secuencia del péptido, o compararlo directamente con una base de datos de péptidos. La Figura 15.12 representa este protocolo típico.

21. G. Siuzdak, "Mass Spectrometry for Biotechnology", Academic Press, New York, 1996, pp. 94.

22. A.P. Snyder, "Interpreting Protein Mass Spectra", Oxford University Press, Oxford, 2000, pp.166-167.

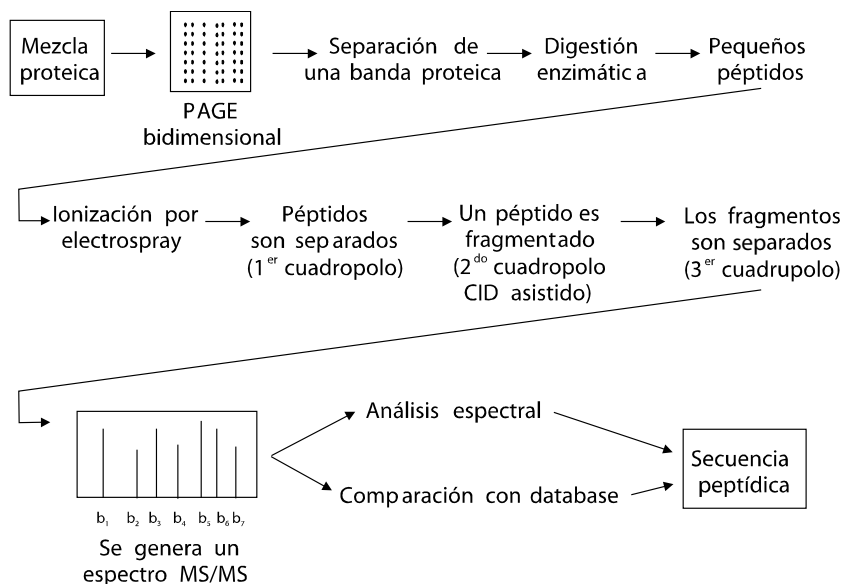


Figura 15.12. Procedimiento típico utilizado para obtener información de una secuencia proteica.

El procedimiento CID causa el rompimiento más o menos al azar de los enlaces peptídicos. Por lo tanto, se obtienen un número de fragmentos que se diferencian por un solo residuo aminoácido. Varios tipos de fragmentos se producen, y su nomenclatura se describe en la Figura 15.13.

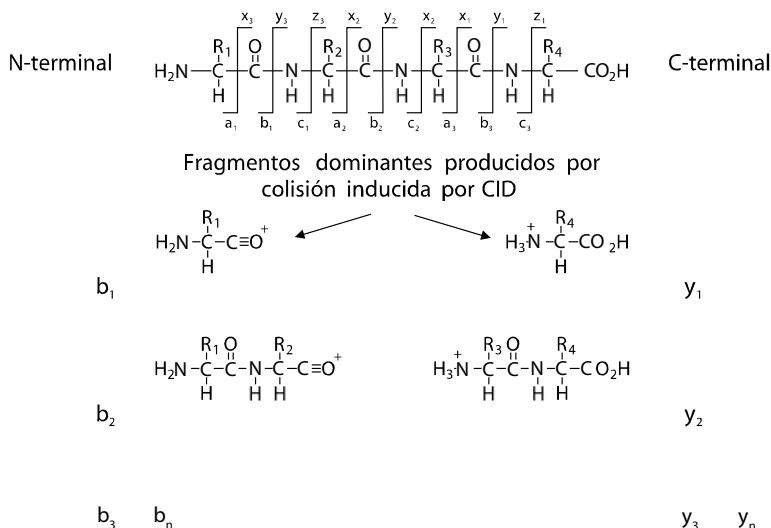


Figura 15.13. La nomenclatura utilizada para los fragmentos más comunes producidos por fragmentación de péptidos mediante CID. Las familias de fragmentos b e y, que se producen cuando un enlace peptídico es quebrado, se producen normalmente en altas concentraciones.

Dos clases principales de iones son formadas mediante el procedimiento CID, los que contienen el extremo carboxílico más uno o varios residuos adicionales (iones de tipo x_n , y_n y z_n) y los que contienen el extremo amino más uno o varios residuos adicionales (iones de tipo a_n , b_n y c_n). Los iones de tipo y_n y b_n se forman por la ruptura de los enlaces tipo amida, y las diferencias de masa entre estos fragmentos se limitan a las masas de los 19 distintos residuos naturales de aminoácidos (Tabla 15.9). La isoleucina y la leucina, que son isómeros estructurales y por lo tanto tienen el mismo peso molecular, no se pueden distinguir mediante MS. Por otra parte, la lisina y la glutamina solo pueden ser diferenciados si la resolución es alta, puesto que su diferencia de masas es de solamente 0,0432 daltons.

Aminoácido	Códigos 3-letras	M_r		
		1-letra	Residuo	Libre
Alanina	Ala	A	71,0786	89,0938
Arginina	Arg	R	156,1870	174,2022
Asparagina	Asn	N	114,1036	132,1188
Acido aspártico	Asp	D	115,0884	133,1036
Cisteína	Cys	C	103,1386	121,1538
Glutamina	Gln	Q	128,1304	146,1456
Acido glutámico	Glu	E	129,1152	147,1304
Glicina	Gly	G	57,0518	75,0670
Histidina	His	H	137,1408	155,1560
Isoleucina	Ile	I	113,1590	131,1742
Leucina	Leu	L	113,1590	131,1742
Lisina	Lys	K	128,1736	146,1888
Metionina	Met	M	131,1922	149,2074
Fenilalanina	Phe	F	147,1762	165,1914
Prolina	Pro	P	97,1164	115,1316
Serina	Ser	S	87,0780	105,0932
Treonina	Thr	T	101,1048	119,1200
Triptofano	Trp	W	186,2128	204,2280
Tirosina	Tyr	Y	163,1756	181,1908
Valina	Val	V	99,1322	117,1474

Tabla 15.9. Masas promedio de aminoácidos en sus estados libres y como residuos. Los códigos de una letra son de uso habitual en el área de la MS. Reproducido, con permiso, de M. Mann and M. Wilm, *Anal. Chem.* **66** (No 24), 1994, 4390-4399. "Error Tolerant Identification of Peptides in Sequence Databases by Peptide Sequence Tags". Copyright © 1994 American Chemical Society.

El proceso de secuenciación consiste en la medida simultánea de una colección de péptidos, según se describe en la Figura 15.14. La secuencia es obtenida por la observación de

las diferencias de masas dentro de una familia de iones; la familia “y” esta completamente representada en este ejemplo. La secuencia obtenida pudo ser asignada a una proteína de membrana de *E. coli*.²³ Con esta instrumentación, es posible analizar péptidos con un MW de hasta 2500 Da, aunque algunas limitaciones se aplican; si solamente se obtiene una colección limitada de péptidos, sólo información limitada de la secuencia podrá ser obtenida.

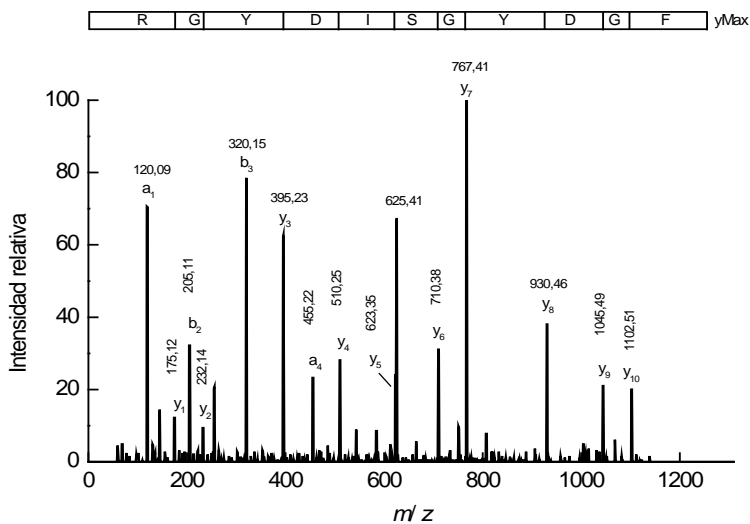


Figura 15.14. Determinación de la secuencia de un péptido utilizando ionización por nanoelectrospray, y un analizador de masas de muy alta resolución (Q-TOF). En el primer cuadrupolo, un ión doblemente cargado del péptido de $m/z = 625,41$ fue seleccionado y convertido en fragmentos más adelante. El espectro CID de m/z rinde la secuencia FGDYGSIDYGR, mostrada en la parte superior de la Figura.²³ Reproducido, con permiso, de E. Gustafsson, K. Thorén, T. Larsson, P. Davidsson, K. Karlsson y C.L. Nilsson. “Identification of Proteins from *Escherichia coli* Using Two-Dimensional Semi-Preparative Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **15**, 2001, 428-432. Copyright © 2001 John Wiley & Sons, Ltd.

Información respecto a la secuencia también puede ser obtenida utilizando el método de degradación de Edman, que remueve residuos del extremo amino-terminal del péptido, dando lugar a una colección de péptidos. MALDI-TOF puede entonces ser utilizado para obtener las masas de los péptidos, y la secuencia determinada por diferencia de masas entre péptidos consecutivos. Esta metodología cuya denominación en inglés es *protein ladder sequencing*, permite que información de secuencias de hasta 30 residuos sean obtenidas. Este método es útil para la identificación de modificaciones post-traduccionales, tales como residuos aminoácidos fosforilados.²⁴

23. E. Gustafsson, K. Thorén, T. Larsson, P. Davidsson, K. Karlsson y C.L. Nilsson. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 2001, 428-432.

24. B.T. Chait, R. Wang, R.C. Beavis y S.B.H. Kent. *Science* **262**, 1993, 89-92.

Una vez que una familia peptídica ha sido secuenciada, el paso siguiente es superponer la información disponible de las diferentes secuencias parciales, para obtener la secuencia completa de la proteína. Sin embargo, las secuencias de los péptidos son utilizadas más habitualmente para identificar las proteínas mediante la búsqueda de estas secuencias peptídicas en bases de datos. Varias bases de datos están disponibles, y se espera que su utilidad se mejore en el futuro, a medida que se incorporan más datos experimentales. A este respecto, debe ser observado que dos espectros de masas son comparables solamente si fueron obtenidos bajo condiciones instrumentales y operacionales muy similares; por lo tanto, varias bases de datos son necesarias, por lo menos una para cada sistema de ionización. Los espectros de MALDI y de ESI son absolutamente diferentes, debido a que estos dos métodos de ionización producen distintos tipos de iones.

15.7 Métodos aplicables a los ácidos nucleicos

El uso de técnicas de MS para el estudio de los ácidos nucleicos ha sido limitado en comparación con las aplicaciones en el área de las proteínas y los polipéptidos. Esto es principalmente debido a la dificultad de ionizar el DNA o el RNA, dado que sus características químicas y estructurales (principalmente la cadena principal que posee carga negativa) previenen que estas moléculas sean eficientemente ionizadas mediante MALDI o ESI (en el modo de ionización positiva). El uso de contraiones de NH_4^+ es un método establecido que permite la producción de iones de oligonucleotidos, pero la sensibilidad y la resolución obtenida es baja. En general, el proceso de la ionización MALDI es muy ineficaz para los ácidos nucleicos en comparación con los péptidos. Generalmente, una cantidad 100 veces superior de DNA tiene que ser utilizada para obtener una intensidad de señal similar a las obtenidas con péptidos.

Otra posibilidad que es utilizada para realzar el proceso de ionización es la modificación química de las moléculas de ácido nucleico para mejorar su volatilidad iónica. Por ejemplo, el reemplazo de los protones del fosfato de la cadena principal del DNA nativo por grupos alquilo²⁵, o el reemplazo de los grupos fosfato por grupos fosforotioato (*phosphorothioate*) seguidos por alquilación han sido informados en la literatura.²⁶

También se ha ensayado la utilización de ESI en el modo de ión negativo, que produce una mejor señal para los nucleótidos. De esta manera se forman iones con múltiples cargas

25. T. Keough, T.R. Baker, R.L. Dobson, M.P. Lacey, T.A. Riley, J.A. Hasselfield y P.E. Hesselberth. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **7**, 1993, 195-200.

26. S. Sauer, D. Lechner y I.G. Gut in "*Mass Spectrometry and Genomic Analysis*", J. Nicholas Housby Ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2001, pp. 51-53.

del tipo $(M-nH)^+$. Medidas de masa con elevada precisión de oligonucleotidos sintéticos de hasta 132 residuos han sido informadas utilizando este método de ionización.²⁷

Casi todos los procedimientos descritos para el análisis de ácidos nucleicos (generalmente DNA) se basan en la amplificación de estas moléculas utilizando PCR. Se han secuenciado cadenas cortas de oligonucleotidos (generalmente hasta 30 nucleótidos), aunque hoy la principal utilidad de la MS en esta área es más bien como método de confirmación de secuencia, y no como método para la determinación de secuencia. Una nomenclatura para los iones fragmentarios con mayor probabilidad de formación ha sido propuesta,²⁸ y un trabajo reciente describe los procedimientos para la secuenciación de DNA usando ionización ESI y fragmentación de los iones²⁹ (espectro CID). La teoría es similar a aquella utilizada para secuenciar proteínas; cuando una serie completa de fragmentos se encuentra, la diferencia de masas entre dos fragmentos consecutivos corresponde a una masa del residuo del nucleótido. En la práctica, sin embargo, las técnicas basadas en MS para la secuenciación de ácidos nucleicos no es competitiva respecto a otros métodos alternativos de secuenciación.

Varios análisis se han patentado para la detección de mutaciones; éstos se diseñan principalmente para el análisis de polimorfismos de un único nucleótido (SNP, *single-nucleotide polymorphism*) y todos ellos utilizan espectrometría MALDI-TOF (Invader, Sequazyme-PinPoint assay, MassARRAY, GOOD assay son algunos nombres comerciales) luego de una etapa de amplificación por PCR, o bien requieren una alta concentración de la DNA en la muestra (Invader).

MAGICchip es un dispositivo genérico de tamaño de un microchip, donde varias áreas pequeñas de gel de poliacrilamida están separados por vidrio hidrofóbico. Varias áreas rectangulares de gel (100 μm) se encuentran sobre un soporte de vidrio, y están separadas entre ellas por 200 μm . Secuencias cortas de DNA se inmovilizan en el gel y se prueban para hibridación; luego de un tiempo estandarizado, se agrega el compuesto de la matriz, se permite su deshidratación, y cada área de gel es analizada por MALDI-TOF. Con este dispositivo, distintas secuencias de SNP son reconocidas por sus masas características.

El análisis denominado SOMA (Short Oligonucleotide Mass Analysis) utiliza la amplificación mediante PCR seguida por incubación con endonucleasas de restricción para digerir el DNA amplificado; los oligonucleotidos pequeños obtenidos son separados por HPLC y analizados posteriormente por espectrometría de masa; un instrumento del tipo ESI-Triple cuadrupolo (empleado en el modo negativo de ionización) es utilizado, generando una "huella digital". Este método se ha utilizado para obtener el genotipo de varias variantes del gen humano relacionando con la poliposis adenomatosa familiar, para el cual algunas variantes han sido asociadas a un riesgo creciente de cáncer colorectal.³⁰

27. N. Potier, A.V. Dorsselaer, Y. Cordier, O. Roch y R. Bischoff, *Nucleic Acid Research* **22**, 1994, 3895-3903.

28. S.A. McLuckey, G.J. Van Berkel y G.L. Glish, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **3**, 1992, 60-70.

29. J. Ni, S.C. Pomerantz, J. Rozenski, Y. Zhang y J.A. McCloskey, *Anal. Chem.* **68**, 1996, 1989-1999.

30. P.E. Jackson, M.D. Friesen y J.D. Groopman en "*Mass Spectrometry and Genomic Analysis*", J. Nicholas Housby Ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2001, pp. 76-92.

15.8 Espectrometría de masa de bacterias

Clásicamente la microbiología ha utilizado como metodología para la identificación o la clasificación de microorganismos las diferencias en sus vías o caminos metabólicos. Más recientemente, la biología molecular ha permitido que los métodos de secuenciación de sus genes o parte de ellos sean utilizados para identificar y/o para clasificar la diversidad microbiológica. La caracterización química (o quimiotaxonomía) de bacterias y de otros organismos puede ser un tercer acercamiento general a la cuestión de la clasificación de la diversidad biológica.

La caracterización química presume que ciertas moléculas son únicas y representativas de cada cepa, especie o grupo de microorganismos, y por lo tanto los espectros de masa pueden ser característicos de un grupo taxonómico dado. Un espectro bacteriano típico obtenido por MALDI-TOF contiene generalmente entre 20 y 40 picos importantes, producidos principalmente por proteínas, fosfolípidos y lipopéptidos cíclicos, en el rango de MW de 4-20 kD.³¹ La ionización mediante ESI es menos utilizada, ya que las muestras que contienen células intactas pueden tapar las boquillas u otras partes del sistema de electrospray, y además la formación de especies con múltiples cargas complica los espectros.

Las células que se desea analizar (han sido estudiadas principalmente bacterias, pero también partículas virales y hongos) típicamente son físicamente o químicamente lisadas; la exposición a la solución de la matriz puede ser suficiente para lisar algunos tipos celulares. En el caso de las esporas, más resistentes a la lisis, estas son digeridas (por ejemplo, con ácidos orgánicos fuertes), y entonces la matriz del MALDI es agregada.

La interpretación de espectros de masa bacterianos se hace con dificultad. En primer lugar, una alta proporción de compuestos celulares son comunes entre diversas cepas y taxones bacterianos superiores. En segundo lugar, la reproducibilidad espectral para una dada cepa bacteriana y protocolo de medición es pobre, inclusive cuando los ensayos son realizados en el mismo laboratorio. Hay un número de fuentes biológicas e instrumentales de variabilidad, incluyendo diferencias en la composición celular para las distintas fases de crecimiento en un mismo cultivo celular, efectos de la composición del medio de cultivo y otros; variaciones muy pequeñas en el cociente entre la muestra y la matriz causan una modificación significativa en los espectros resultantes. La Figura 15.15 muestra espectros bacterianos típicos obtenidos para una cepa de *E.coli*; observe que muchos picos son comunes a ambos espectros. Esfuerzos para mejorar la reproducibilidad están siendo realizados por varios grupos, donde se han obtenidos algunos resultados promisorios.³³

31. C. Fenselau y P.A. Demirev, *Mass Spectrometry Reviews* **20**, 2001, 157-171.

32. Z. Wang, L. Russon, L. Li, D.C. Roser y S.R. Long, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **12**, 1998, 456-464.

33. A.J. Saenz, C.E. Petersen, N.B. Valentine, S.L. Gantt, K.H. Jarman, M.T. Kingsley y K.L. Wahl. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **13**, 1999, 1580-1585.

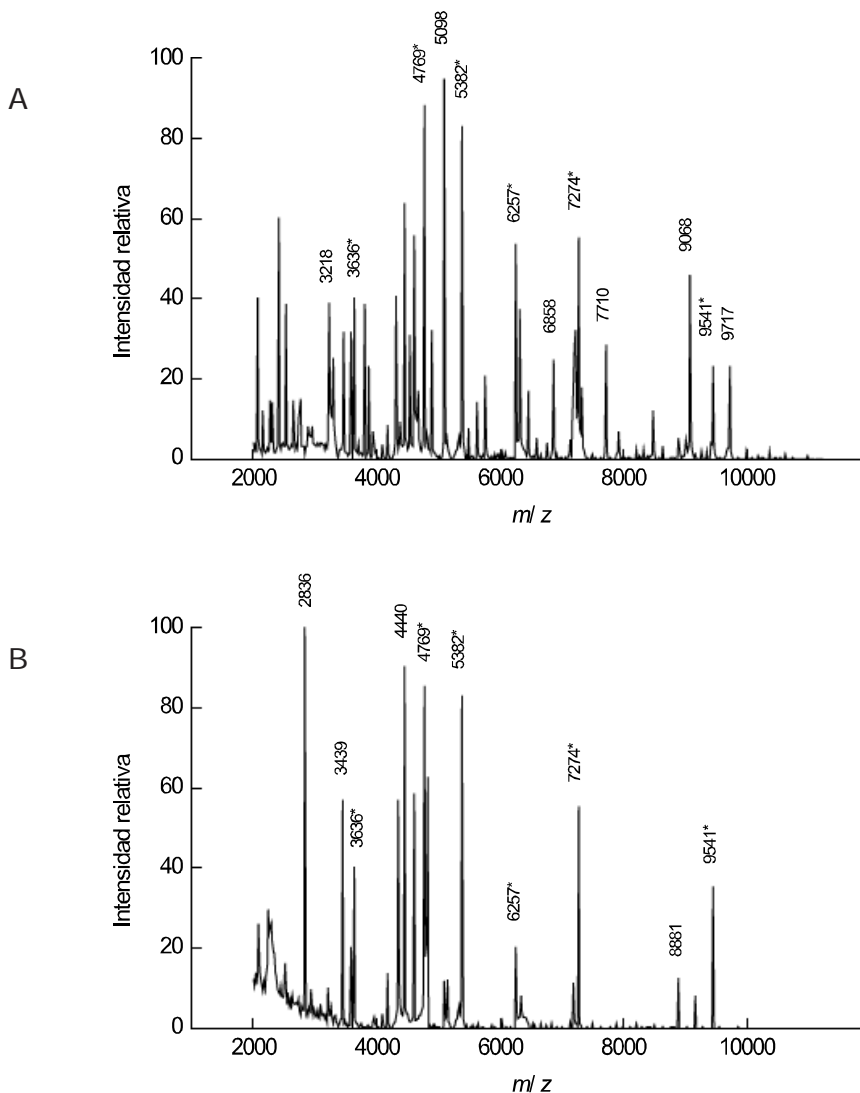


Figura 15.15. Comparación de los espectros MALDI de *E. coli* (cepa ATCC 11775) realizados con cultivos crecidos en diferentes laboratorios, bajo las mismas condiciones experimentales. Los asteriscos señalan picos que son comunes a los dos espectros.^{31,32} Línea superior reproducido, con permiso, de Z. Wang, L. Russon, L. Li, D.C. Roser y S.R. Long, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **12**, 1998, 456-464. “Investigations of Spectral Reproducibility in Direct Analysis of Bacteria Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry”. © 1998 John Wiley & Sons, Ltd. Línea inferior reproducido, con permiso, de Catherine Fenselau y Plamen A. Demirev, *Mass Spectrometry Reviews* **20**, 2001, 157-171. “Characterization of Intact Microorganisms by Maldi Mass Spectrometry. Copyright © 2002 by John Wiley & Sons, Inc.

Dos acercamientos principales se han utilizado para interpretar espectros de masa bacterianos. Primero, se han utilizado métodos de reconocimiento de patrones, para los que se obtienen espectros de referencia en condiciones altamente estandarizadas, de diversos microorganismos, de tal manera de generar una colección de “huellas digitales”. Un espectro bacteriano desconocido obtenido utilizando las mismas condiciones puede luego ser comparado con la colección, y se asocia o asimila a determinada especie o cepa microbiana si esto es posible.

Un segundo acercamiento explota la información contenida en bases de datos genómicas y proteicas. Las masas de un sistema de proteínas de la cepa bacteriana en estudio se determinan y se utilizan para buscar en las bases de datos, para asimilarla o asociarla a determinada proteína en las bases. Este procedimiento se ha utilizado como método para distinguir entre *B. subtilis* y *E. coli*, dos organismos cuyos genomas han sido secuenciados totalmente.³⁴

15.9 Lecturas sugeridas

- G. Siuzdak. “*Mass Spectrometry for Biotechnology*”, Academic Press, New York, 1996.
 B.S. Larsen y C.N. McEwen, Ed., “*Mass Spectrometry of Biological Materials*”, Marcel Dekker, New York, 1998.
 A.P. Snyder, “*Interpreting Protein Mass Spectra*”, Oxford University Press, Oxford, 2000.
 C. Dass. “*Principles and Practice of Biological Mass Spectrometry*”, Willey-Interscience, New York, 2001.
 J.R. Chapman, Ed., “*Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*”, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2000, 538 pp.

15.10 Problemas

1. Calcule la masa monoisotópica y la masa promedio (M_r) para las moléculas siguientes (Tabla 15.10).

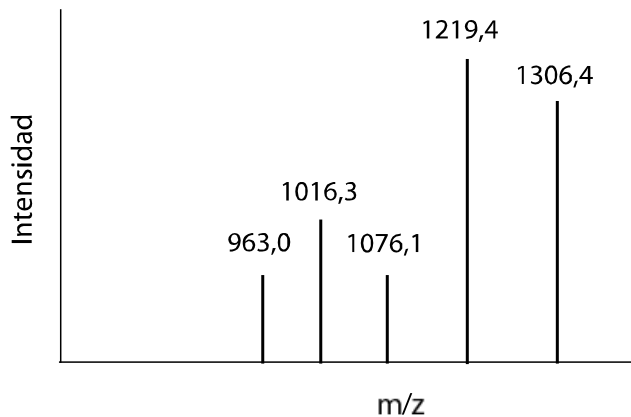
Compuesto	Fórmula	Monoisotópica	Promedio
Glicina	$C_2H_5NO_2$		
Triptófano	$C_{11}H_{12}N_2O_2$		
Polipéptido	$C_{84}H_{101}N_{15}O_{14}$		
Insulina porcina	$C_{256}H_{381}N_{65}O_{76}S_6$		
Mioglobina	$C_{769}H_{1212}N_{210}O_{218}S_3$		
Proteína heterodímera grande	$C_{1802}H_{2933}N_{532}O_{462}S_{12}$		

34. J.O. Lay, Jr. *Mass Spectrometry Reviews* **20**, 2001, 172-194.

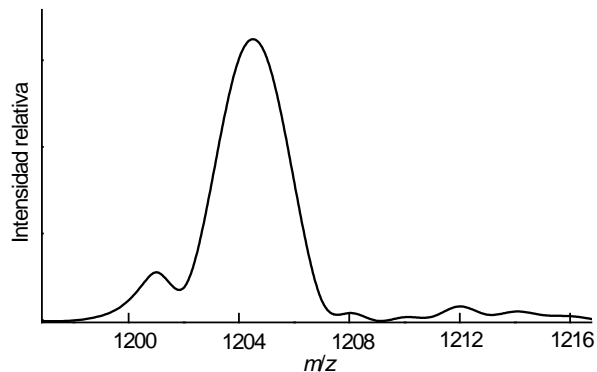
2. ¿En qué caso (MW bajo o alto) es la intensidad del pico monoisotópico mayor que la intensidad del pico isotópico?

3. Una molécula proteica es protonada en un sistema ESI de nanoelectrospray, y analizaba con un filtro de masas (cuadrupolo). La M_r (masa promedio) de esta proteína es 23.630,36. Utilice la nomenclatura adecuada para simbolizar la familia de iones moleculares producidos, para el rango +1 a +6. Calcule la masa de cada ión, y su posición en el espectro de masas obtenido.

4. β -lactoglobulina fue purificada, y un espectro ESI fue obtenido, según puede observarse en la Figura 15.16 a continuación. Calcule la masa de la proteína para cada pico y el promedio para todos los picos. Presente una hipótesis para explicar la ausencia de especies con pocas cargas.



5. Calcule la resolución para el siguiente espectro de masas (Figura 15.17) a continuación.



CAPÍTULO 16

VALIDACIÓN DE NUEVOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS

16.1 Introducción

La validación tiene la meta fundamental de seleccionar el mejor método disponible para la detección y/o la cuantificación de un analito, sobre la base de datos objetivos acerca de su performance. Distintas regulaciones requieren que los laboratorios clínicos demuestren documentación acerca de los datos de validación obtenidos cuando se introducen nuevos ensayos. Estos datos son también importantes para el control de calidad y para localizar problemas en los métodos de análisis utilizados. El uso acertado de un análisis depende primero de una comprensión fundamental de los principios analíticos que gobiernan ese análisis. Las características de un ensayo o método de análisis tales como precisión, exactitud y límite de detección dependen de las características de los componentes, del formato del análisis y del sistema de detección. Por ejemplo, los análisis manuales y automatizados pueden tener problemas asociados a la sincronización o a las velocidades de reacción, pero se puede esperar que el método automatizado tenga mejor precisión en la distribución de los reactivos. Ambos pueden tener baja precisión como consecuencia de la baja concentración del analito o una reacción donde se alcanza el equilibrio lentamente. Incluso cuando el análisis se ha optimizado en teoría, el procedimiento de mesada, práctico, requiere cuidado y habilidad técnica para el funcionamiento óptimo de la técnica. Una recuperación completa en cada paso debe ser comprobada independientemente, por ejemplo, usando un trazador independiente para seguir el progreso de una reacción. Las velocidades de equilibrio pueden ser muy sensibles a la temperatura, el orden de la adición de los reactivos y las velocidades de agitación. El ensayo de estándares en cada serie de ensayos, siendo medidos exactamente de la misma manera que las muestras posibilitan corregir algunos errores de menor importancia; sin embargo, una pobre sincronización o control de la temperatura da lugar a menudo a coeficientes de variación crecientes para mediciones de una misma muestra (replicas). Los tiempos de incubación (cuando esta es necesaria) se reducen a menudo al mínimo, y a las incubaciones a temperatura ambiente son comunes; si no se ha alcanzado el equilibrio, las variaciones técnicas de menor importancia puede tener efectos importantes en las mediciones realizadas (por ejemplo, la temperatura ambiente puede variar considerablemente entre el verano y el invierno).

Se deben tomar decisiones acerca del método basadas en la calidad de los datos producidos, y los criterios de calidad deben ser establecidos. Esto no es una tarea trivial, puesto que los nuevos documentos guía se elaboran continuamente para determinar si un método analítico se puede utilizar para un análisis cuantitativo, o si un nuevo método puede sustituir otro establecido (estándar). Los documentos guía y las regulaciones han sido elaboradas por agencias de carácter local e internacionales para la aprobación de nuevos métodos, para proteger la salud pública, la calidad alimentaria y otras áreas sensibles

Varios niveles de la validación son generalmente definidos. Por ejemplo, los métodos propuestos para ser utilizados por laboratorios en todo mundo, para aplicaciones relacionadas a la medicina y química clínica deben demostrar datos de la más alta calidad relacionados con la precisión y la exactitud¹, mientras que los métodos analíticos usados para propósitos de investigación no requieren una validación tan exhaustiva. Altos niveles de validación implican el trabajo concurrente de varios laboratorios y el análisis de una gran cantidad de muestras; esto tiende a ser muy costoso e impráctico para métodos utilizados localmente u ocasionalmente.

Organizaciones internacionales como la AOAC Internacional (International Association of Official Analytical Chemists), FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), AIEA (International Atomic Energy Agency), IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), ISO (International Organization for Standardization), han producido pautas o normas internacionales que se pueden utilizar conjuntamente con las diversas normas locales utilizadas en distintos laboratorios alrededor del mundo. En el caso específico de los análisis biomédicos, las regulaciones están contenidas en el CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments), cuya aplicación es responsabilidad de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, US Food and Drug Administration). El seguimiento de los procedimientos de validación establecidos es un paso necesario para obtener la aprobación de las entidades reguladoras para utilizar un nuevo método analítico, o bien para utilizar un método previamente aprobado para una nueva aplicación analítica.

Los métodos, definiciones y parámetros utilizados para validar métodos analíticos y bioanalíticos no son universales; varían con el tipo de análisis y de la agencia o entidad reguladora. Introducimos aquí las figuras de mérito más ampliamente utilizadas acompañadas de sus definiciones generalmente aceptadas. Los procedimientos estadísticos básicos también son presentados. Fuentes adicionales de información y procedimientos técnicos se ofrecen en la bibliografía.

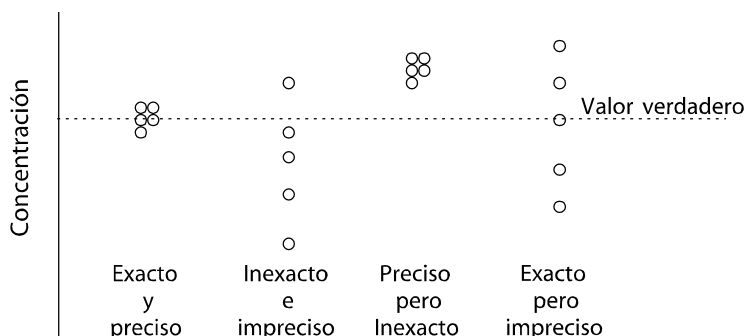
Los métodos bioanalíticos se clasifican según la clase de resultados que proporcionan. Los análisis *cualitativos* proporcionan información acerca de la presencia o la ausencia del analito, mientras que los análisis *cuantitativos* informan de la concentración del analito en la muestra, así como la incertidumbre asociada a ese valor. Los métodos *semi-cuantitativos* proporcionan una estimación de la concentración del analito, informando si el analito esta

1. V.P. Shah, K.K. Midha et al. *Pharmaceutical Research* **17**, 2000, 1551-1557.

presente en una concentración superior o inferior a una dada concentración de referencia; por ello el reporte de un método de este tipo puede establecer si la concentración es superior, inferior o similar que el valor de referencia.

16.2 Precisión y exactitud

La incertidumbre puede clasificarse en dos grandes grupos: El *error al azar*, que está siempre presente en los datos experimentales y nunca puede ser eliminado totalmente. Este tipo de error o “ruido” puede resultar de la naturaleza azarosa de las colisiones que conducen a las reacciones químicas o bioquímicas, o puede ser causado por pequeñas fluctuaciones de potencial (voltaje) u otros parámetros eléctricos en la instrumentación utilizada en la medida. El error al azar causa desviaciones positivas y negativas del valor verdadero, y afecta la precisión de los resultados. La precisión se discute generalmente en términos de la desviación estándar (s) y de la desviación estándar relativa (RSD), ambos definidos más adelante en este Capítulo. El *error sistemático* es producido por errores más o menos constantes, resultando en una desviación positiva o negativa constante de los valores medidos respecto a los valores verdaderos. Por ejemplo, las medidas de absorbancia que no se corrigen por la absorbancia de una solución blanco (de igual o similar composición que la muestra pero sin el analito), producirán resultados experimentales que son sistemáticamente más altos que la concentración verdadera. Los errores sistemáticos afectan la exactitud de los resultados, y son estudiados por comparación de los resultados experimentales con los valores de concentración “verdaderos” utilizando materiales de referencia certificados o medidos con otro método analítico que se sepa muy exacto. En principio, el error sistemático se puede eliminar de los resultados experimentales, porque la causa del error puede ser encontrada y eliminada. La Figura 16.1 muestra una comparación gráfica de las definiciones aquí empleadas de precisión y la exactitud.



Clasificación de resultados

Figura 16.1. Precisión y exactitud no son sinónimos.

16.3 Media y varianza

La *media aritmética* (\bar{x}) y la *desviación estándar* (s) se definen como sigue, donde n es el número de medidas individuales y x_i son los valores de esas mediciones.

$$\bar{x} = \sum \frac{x_i}{n} \quad [16.1]$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad [16.2]$$

La desviación estándar calculada s es un buen estimador de la desviación estándar de la población σ si el número de mediciones es suficientemente alto. Una forma alternativa equivalente de la Eq. 16.2 se presenta en la Eq. 16.3; esta forma es más útil cuando se utiliza una calculadora no programable.

$$s = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n-1}} \quad [16.3]$$

La *varianza* (s^2) de las muestras se utiliza en lugar de s para algunos usos.

16.4 RSD y otros estimadores de precisión

La *precisión* (según lo discutido previamente) es la capacidad del análisis de informar el mismo resultado cuando es repetido muchas veces durante un mismo día, o bien entre mediciones realizadas en diferentes días. Los datos de precisión se recogen generalmente en las primeras etapas de evaluación de un nuevo método, puesto que la calidad del método depende del nivel de precisión. Si la precisión es pobre, experimentos más elaborados de validación deben ser pospuestos hasta que las fuentes de la imprecisión sean identificadas y controladas.

La *desviación estándar relativa* (RSD, relative standard deviation) y el *coeficiente de variación* (CV, coefficient of variation), son utilizados como estimadores de la precisión, y están definidos por las ecuaciones siguientes:

$$\text{RSD} = \frac{s}{x} \quad [16.4]$$

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad [16.5]$$

Otros parámetros usados con frecuencia son la *desviación media absoluta* (MAD, mean absolute deviation), la que se utiliza como estimador de la dispersión de grupos de observaciones únicas, y el error estándar de la media (SEM, standard error of the mean), que se utiliza para calcular los límites de confianza de un valor medio. Sus fórmulas se presentan abajo:

$$MAD = \frac{\sum |x_i - \bar{x}|}{n} \quad [16.6]$$

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad [16.7]$$

La precisión varía con la concentración; debido a esto, la precisión se debe evaluar en las regiones bajas, medias y altas de concentración de la curva estándar, y se debe evaluar en las diversas matrices correspondientes a las muestras que serán analizadas. El perfil de precisión (Sección 16.4.3) se utiliza para establecer el rango de trabajo del método de análisis propuesto.

16.4.1 Distribución de errores y límites de confianza

Cuando los valores de concentración obtenidos midiendo repetidas veces muestras replicadas son graficados, la curva que se obtiene frecuentemente corresponde a una distribución normal (o gaussiana). La curva normal es simétrica alrededor de \bar{x} , y cuanto mayor es el valor de s , más ancha es la extensión de la curva sobre el eje horizontal.

Otra característica importante de la distribución normal es que aproximadamente el 95% de los valores de los datos se encuentra dentro de $\pm 2s$, y 99,7% dentro del rango $\pm 3s$, según se muestra en la Figura 16.2. Esta distribución del error en una distribución normal permite el cálculo de los intervalos de confianza para \bar{x} . El intervalo de confianza es el rango de concentración dentro del cual se espera que la concentración verdadera de la muestra se encuentre, para un dado grado de confianza. Por lo tanto, el tamaño del intervalo depende del grado de confianza (para una mayor confianza, un intervalo mayor es requerido), del valor de s y del tamaño de la muestra n , según puede observarse en la Eq. 16.8, para un intervalo de confianza del 95%

$$x = \bar{x} \pm \frac{2s}{\sqrt{n}} \quad [16.8]$$

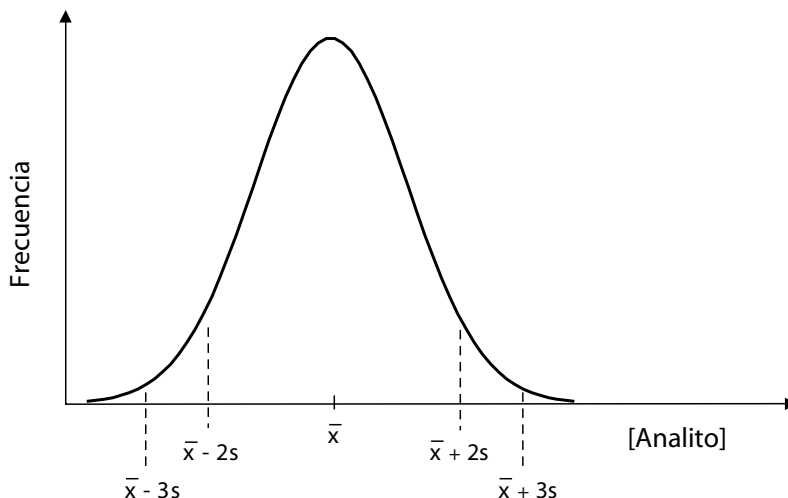


Figura 16.2. Distribución Gaussiana (normal).

Otros límites utilizados comúnmente son el 99,0% y el 99,7%, como se muestra en las Eqs. 16.9 y 16.10 respectivamente.

$$x = \bar{x} \pm \frac{2,58s}{\sqrt{n}} \quad [16.9]$$

$$x = \bar{x} \pm \frac{2,97s}{\sqrt{n}} \quad [16.10]$$

Cuando el tamaño de muestra (n) es pequeño, los valores de la distribución t de Student son utilizados, según se muestra en la Ecuación siguiente.

$$x = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}} \quad [16.11]$$

Los valores del estadístico t se encuentran tabulados para los intervalos de confianza y los grados de libertad de uso general ($n-1$).

16.4.2 Regresión lineal y calibración

Cuando se observa una relación lineal entre dos variables, el grado de correlación puede ser cuantificado aplicando regresión lineal y ajustando por el método de cuadrados mínimos. Este método determina la ecuación para la mejor línea recta que se ajusta a los datos experimentales.

La recta tiene la forma de la Eq. 16.12, donde x e y son variables, a es la pendiente y b es la ordenada de origen. La regresión lineal determina los mejores valores de a y de b , junto con sus incertidumbres.

$$y = ax + b \quad [16.12]$$

Una relación lineal entre un parámetro mensurable (como absorbancia) y la concentración es notoria en muchos métodos analíticos, y el método de los cuadrados mínimos se utiliza para encontrar la mejor curva de calibración

Normalmente se necesitan un mínimo de 6-8 puntos para asegurar la linealidad de la curva de calibración y calcular los parámetros de la regresión. En este caso, las ecuaciones siguientes se utilizan para calcular los valores de a y de b , así como sus límites de confianza. Asumimos que $\sigma \approx s_y$ y que σ es independiente de x .

$$a = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{D} \pm \sqrt{\frac{n s_y^2}{D}} \quad [16.13]$$

$$a = \bar{a} \pm s_a \quad [16.14]$$

$$b = \frac{\sum y_i \sum (x_i)^2 - \sum x_i \sum x_i y_i}{D} \pm \sqrt{\frac{s_y^2 \sum (x_i)^2}{D}} \quad [16.15]$$

$$b = \bar{b} \pm s_b \quad [16.16]$$

donde

$$D = n \sum (x_i)^2 - (\sum x_i)^2 \quad [16.17]$$

y

$$s_y^2 = \frac{\sum (y_i - y_{pred})^2}{n - 2} \quad [16.18]$$

Para determinar \bar{x} a partir de un valor medido de $\bar{y} \pm s_y$:

$$x = \frac{y - b}{a} \pm \left(\frac{y - b}{a} \right) \sqrt{\left(\frac{\sqrt{s_y^2 + s_b^2}}{y - b} \right)^2 + \left(\frac{s_a}{a} \right)^2} \quad [16.19]$$

$$x = \bar{x} \pm s_x \quad [16.20]$$

donde y_{pred} es la y predecida por la curva de calibración, s_y es el error estándar del estimador (denotado a veces $s_{(y/x)}$), t es el estadístico de Student, tabulado para dados niveles de confianza, y n es el número de puntos en la curva de calibración. Los límites de confianza para x son calculados con la Ecuación 16.11

El coeficiente de correlación r , o más frecuentemente r^2 se utiliza para calcular la calidad de la línea de calibración obtenida (Eq. 16.21). Un valor de 1 indica una correlación positiva perfecta; valores superiores a 0,95 son considerados generalmente aceptables.

$$r^2 = \frac{[\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2} \quad [16.21]$$

16.4.3 Perfiles de precisión²

Los perfiles de precisión son útiles para establecer el rango de concentración (para un nivel dado de precisión) para el cual un método puede ser utilizado. La precisión es generalmente peor cuanto más baja es la concentración del analito. La Figura 16.3 muestra cómo el rango dinámico (o de trabajo) para un determinado ensayo es determinado. En la Figura 16.3B, el rango dinámico del análisis se muestra, y ha sido definido en este ejemplo como aquella parte del rango donde el CV es menor al 10%. Los perfiles de precisión son medios muy útiles para comparar dos métodos analíticos que miden el mismo analito.

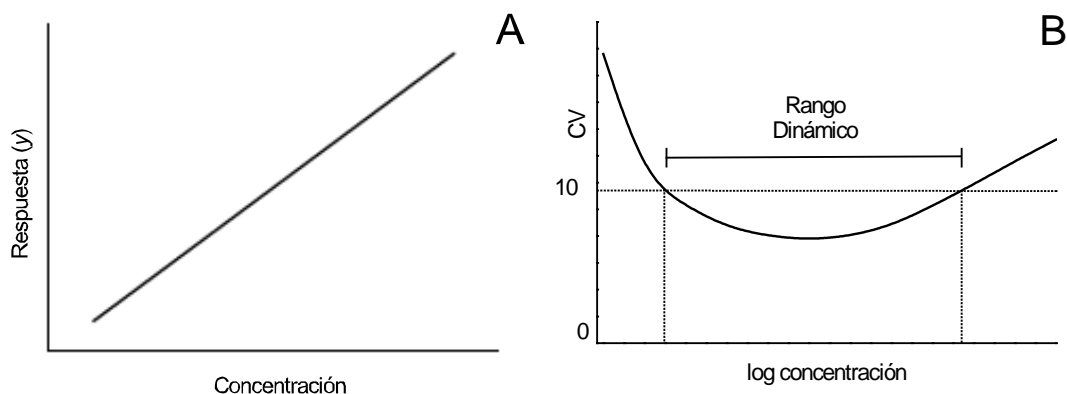


Figura 16.3. Se observa una curva de calibración lineal (A), mientras que en (B) el logaritmo de la concentración se ha trazado para reconocer la pobre precisión en ambos extremos del rango dinámico. Si una precisión más baja es aceptable, el rango dinámico será más amplio.

Los estudios de precisión se pueden realizar bajo diversas condiciones, y son influenciados fuertemente por variables tales como la temperatura, procedencia y calidad de los reactivos, reproducibilidad en la entrega y mezcla de los reactivos y ruido instrumental. Por lo tanto, si todos los estudios de precisión se hacen en el mismo

2. W. Horwitz, *Anal. Chem.* **54**,1982, 67A-76A.

laboratorio (estudio *intra-laboratorio*) una precisión más alta es esperada, en comparación con los estudios realizados *inter-laboratorio*, donde varios laboratorios producen los datos que se utilizarán para preparar el perfil de precisión. Además de esto, los estudios de precisión intra laboratorio se clasifican como *intra-análisis*, donde el perfil se obtiene mediante mediciones replicas realizadas el mismo día, usando los mismos reactivos (mismas disoluciones) y mismo operador, o el *inter-análisis*, donde el perfil de precisión es obtenido por la comparación de los datos obtenidos en distintos días. Una precisión más pobre se obtiene generalmente en estudios tipo *inter-análisis*.

16.4.4 Límite de cuantificación y detección

El límite de detección (LOD) se define como esa concentración del analito que produce una señal perceptiblemente diferente de la señal del blanco o señal de fondo (b). Para su uso con fines prácticos el significado de “perceptiblemente diferente” se define generalmente como la señal del blanco más 2 desviaciones estándar de un blanco bien caracterizado (s_b). Bien caracterizado significa al menos 10 mediciones del blanco.

$$y_{\text{LOD}} = b + 2s_b \quad [16.22]$$

El valor de LOD entonces se calcula de los parámetros de la regresión lineal obtenidos de los datos de calibración,

$$(b + 2s_b) = ax + b \quad [16.23]$$

donde x es la concentración en el límite de detección del análisis.

El límite de cuantificación (LOQ) es definido por el máximo nivel aceptable de incertidumbre en los valores medidos, y considerado generalmente como la concentración del analito que produce una señal igual a la señal del blanco más diez desviaciones estándar, según se muestra mas abajo. Esta así como también algunas definiciones alternativas de LOD y de LOQ han sido detalladas en otros tratados.³

$$y_{\text{LOQ}} = b + 10s_b \quad [16.24]$$

3. P. Willetts y R. Wood en “*Principles and Practices of Method Validation*”, A. Fajgelj y A. Ambrus Eds., Royal society of Chemistry, Cambridge, UK, 2000, pp. 271-288

16.4.5 Linealización de curvas sigmoideas (modelo Log-Logit de cuatro parámetros)

Cuando un análisis presenta una curva de calibración no lineal (Figura 16.4), los datos se pueden linealizar usando funciones estándar.⁴ La función Log-Logit transforma una curva sigmoidea con un solo punto de inflexión en una línea recta, y se utilizan extensivamente con datos obtenidos en inmunoensayos competitivos

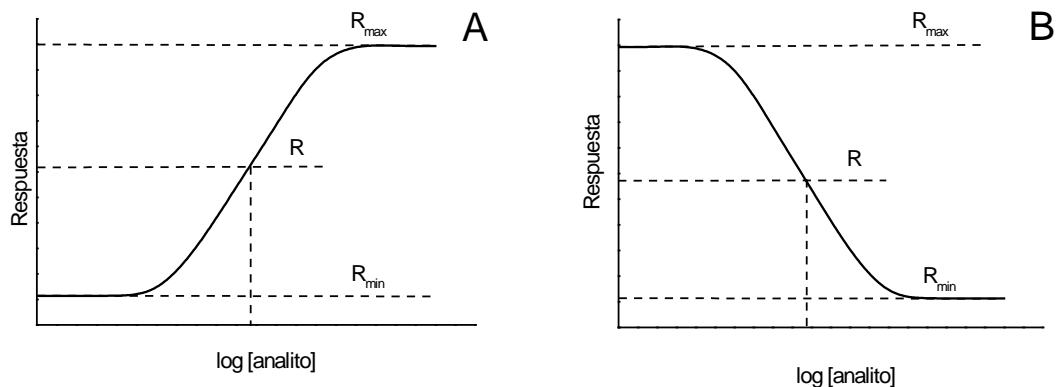


Figura 16.4. Curvas de respuesta sigmoideas: respuestas de tipo positivas (A) y negativas pueden observarse (B).

Un primer paso para linealizar una curva sigmoidea es normalizar los valores de respuesta de modo que $0 < y < 1$. Los valores normalizados se pueden calcular utilizando la Eq. 16.25.

$$y = \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R_{\min})} \quad [16.25]$$

Los datos entonces se linealizan usando la función logit:

$$\text{logit}(y) = \ln \frac{(1 - y)}{y} \quad [16.26]$$

Los valores obtenidos para el $\text{logit}(y)$ entonces se grafican versus $\log[\text{analito}]$, obteniéndose un diagrama lineal según se puede observar en la Figura 16.5.

4. B. Nix y D. Wild en “*The Immunoassay Handbook*”, D. Wild, Ed., 2nd Ed., Nature Publishing Group, New York, 2001, pp. 198-210.

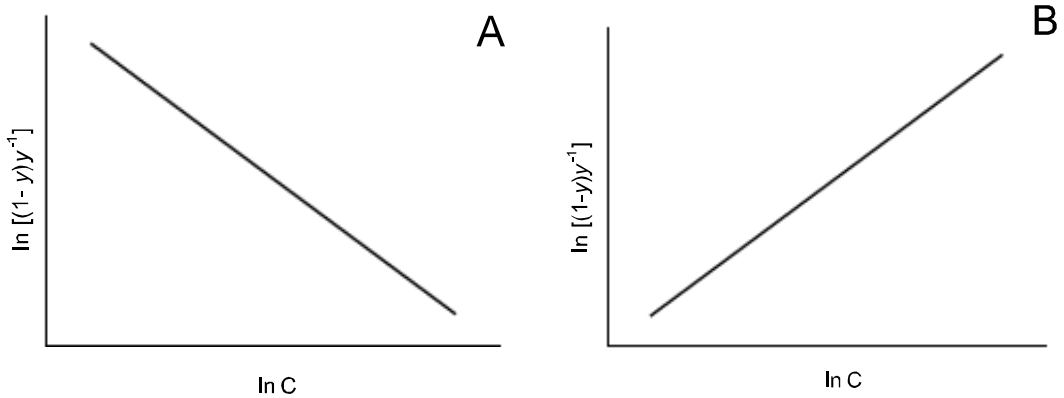


Figura 16.5. Diagramas lineares obtenidos usando la función logit. (A), cuando la respuesta aumenta con la concentración y (B) cuando la respuesta disminuye con la concentración.

16.4.6 Método de la dosis efectiva

Este método es utilizado para estimar las concentraciones del analito por inmunoensayo con la máxima precisión. Diluciones seriales de una solución estándar del analito son preparadas y ensayadas; y paralelamente diluciones seriales de la muestra incógnita también son preparadas y ensayadas. Las respuestas de ambas series de dilución se grafican respecto al \log_{10} del factor de dilución, según puede observarse en la Figura 16.6.

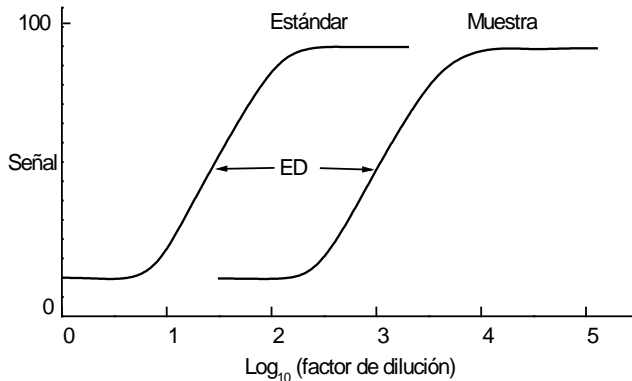


Figura 16.6. Mediante el trazado de las respuestas de estándares y las respuestas de muestras incógnitas, la dosis efectiva (ED) se puede calcular gráficamente.

La mejor precisión (RSD más baja) ocurre en el punto más empinado de las curvas. La diferencia entre estos puntos (incógnita menos estándar) es la *dosis efectiva* (ED):

$$ED = \log_{10} (\text{dilución de la incógnita}) - \log_{10} (\text{dilución del estándar}), \quad [16.27]$$

$$ED = \log_{10} \frac{[\text{incognita}]}{[\text{estandar}]} \quad [16.28]$$

por lo tanto, la concentración desconocida se puede calcular de la Eq. 16.29:

$$[\text{incógnita}] = [\text{estándar}] \times 10^{ED} \quad [16.29]$$

16.5 Estimación de la exactitud

La exactitud es la capacidad de cualquier análisis de proporcionar un resultado “correcto”. Idealmente, el análisis debe detectar todo el analito (recuperación del 100%) y nada más en la muestra (ninguna interferencia o reactividad cruzada). Para estimar la exactitud del método, los resultados obtenidos con el método que se está ensayando deben ser comparados con las concentraciones verdaderas en las muestras. Un procedimiento probado y utilizado habitualmente implica el uso de un *material de referencia estándar*, en el cual la concentración del analito se conoce con muy alta exactitud y precisión. Sin embargo, materiales de referencia estándares muchas veces no están disponibles para los analitos bioquímicos. Cuando un material de referencia no está disponible, la exactitud se puede establecer por la comparación con los resultados obtenidos utilizando técnicas analíticas alternativas previamente validadas, o respecto a métodos habitualmente aceptados. Pruebas intra laboratorio acerca de los efectos e interferencias que puedan estar presentes en la matriz analítica también son conducidos para establecer la exactitud de un nuevo método.

16.5.1 Estandarización

Las soluciones estándar son la base fundamental para la exactitud de los análisis. En la preparación de estándares, es generalmente necesario aceptar, al menos hasta que se demuestre lo contrario, las siguientes consideraciones relacionadas con la pureza y el comportamiento de los estándares. Los estándares y las muestras se asume que reaccionaran con los reactivos del análisis de la misma manera, y los efectos de la matriz se asume que estarán ausentes. Además, las soluciones de estándar deben ser diluciones de una solución stock del material altamente purificado. A menudo, en el caso de una hormona u otra molécula compleja, se le asigna al estándar un valor de concentración o de unidades más o menos arbitrarias basándose en una comparación con una curva estándar considerada como un patrón de concentración, preparada a partir de un estándar internacional.

16.5.2 Efectos de la matriz

16.5.2.1 Recuperación.

Los experimentos de recuperación se diseñan para demostrar si un método mide todo el analito presente en la muestra, o solo una fracción del mismo. Las interacciones con los componentes de la matriz (como la formación de complejos) pueden prevenir en ocasiones que una fracción del analito presente sea detectado.

La recuperación de una cantidad conocida de analito presente en determinada matriz analítica (muestra) ha sido considerada una prueba de exactitud. Para que esto sea verdad, el material estándar debe ser puro y la matriz no debe interferir con las reacciones de cuantificación. Cuando se han fijado las condiciones experimentales, los ensayos de recuperación implican el agregado de cantidades crecientes del analito a una muestra con la matriz que se desea ensayar (concentración basal). La recuperación (R) se calcula de la diferencia entre la señal de la matriz base y la matriz con agregado de analito, y es igual a (concentración medida – concentración inicial)/(concentración agregada). El volumen agregado debe ser pequeño (menos el de 10% del volumen total), de modo que la matriz permanezca esencialmente sin cambios por el agregado de estándar. La recuperación (%) se puede calcular usando la Ecuación siguiente:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración medida} \times 100}{\text{Concentración calculada}} \quad [16.30]$$

Los valores de recuperación obtenidos a distintas concentraciones son utilizados para construir el diagrama de recuperación, según puede observarse en la Figura 16.7, donde linealidad con una pendiente igual a 1 demuestra una recuperación del 100%. Cuando la recuperación es > 90% se considera que es aceptable para bioensayos. En la misma Figura, las desviaciones del comportamiento ideal previstas a altas y bajas concentraciones se exponen.

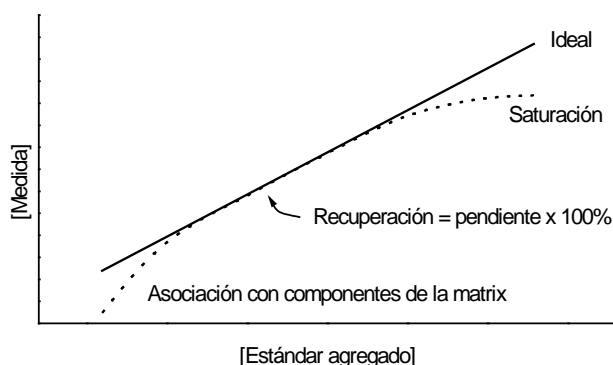


Figura 16.7. Diagrama de recuperación. Una recuperación baja puede ser explicada por la asociación del analito con los componentes de la matriz, las pérdidas de analito durante la manipulación de la muestra, o la concentración inadecuada de los reactivos utilizados en el análisis.

16.5.2.2 Paralelismo.

El experimento de paralelismo se utiliza para determinar si la exactitud de un análisis depende de la concentración del analito en la muestra usada. Esta característica se prueba diluyendo una muestra de estándar, y determinando si los resultados coinciden después de la corrección por dilución. Alternativamente, los resultados se pueden graficar respecto a los valores previstos, para producir idealmente una línea recta plana en la cual la concentración es independiente del factor de dilución. El diluyente se debe seleccionar cuidadosamente para asegurar una matriz constante entre las diluciones. El fallo de la prueba de paralelismo puede indicar una sensibilidad extrema del análisis a la composición de la matriz, la carencia de sensibilidad en los extremos de la curva estándar o estándares inexactos.

El comportamiento no ideal en diluciones bajas (según lo expuesto en la Figura 16.8) puede resultar de la asociación del analito con los componentes de la matriz, de la asociación de los reactivos del análisis con los componentes de la matriz, de la presencia activadores o inhibidores enzimáticos en la matriz y/o de contribuciones no específicas a la señal, como por ejemplo de la turbidez o absorbancia de fondo.

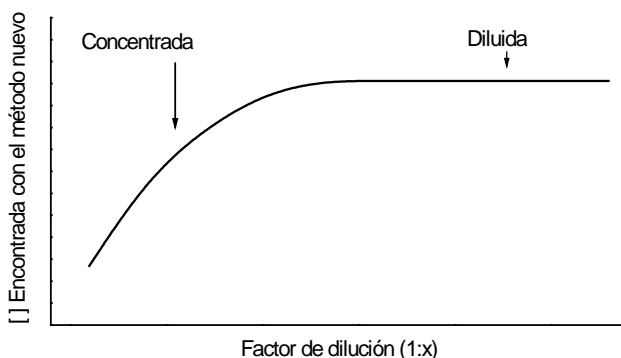


Figura 16.8. Diagrama de paralelismo. Cuando la dilución es elevada, el efecto de la matriz se reduce al mínimo. La curva ideal es una línea horizontal plana, donde la concentración medida (después de corregirla por el factor de dilución) es independiente del factor de dilución.

16.5.3 Interferencias

Interferencias son aquellas sustancias que pueden estar presentes en la muestra, causando sobrestimación o subestimación de la concentración verdadera del analito. Estas especies a menudo se relacionan estructuralmente con el analito, y reaccionan con los reactivos del análisis de maneras similares ocasionando interferencia positiva o sobrestimación.

Esta clase de interferencia se suele llamar reactividad cruzada, o interferencia específica, y es cuantificada generalmente ensayando (midiendo con el mismo protocolo) a la sustancia sospechada de interferencia en ausencia del analito. Los procedimientos de validación implican ensayar una gran cantidad de potenciales interferencias en concentraciones superiores a sus niveles previstos o normales en muestras verdaderas. Los métodos para el estudio de la reactividad cruzada para los inmunoensayos han sido descritos en el Capítulo 6.

16.6 Ensayos cualitativos (cribado, screening)

Como fue mencionado al principio de este Capítulo, los análisis cualitativos informan si el analito está presente o no en la muestra. Un resultado cualitativo tipo “si/no” es importante en muchos análisis clínicos, donde la presencia de cierto anticuerpo, por ejemplo, indica un estado de enfermedad sin importar su concentración. Los métodos instrumentales automatizados, sin embargo, proporcionan resultados numéricos, y es la conversión de estos resultados numéricos en un formato binario tipo “si/no” un componente importante del proceso de validación. La conversión al formato binario requiere un *valor de corte* (*cutoff value*). Este valor se puede seleccionar como la señal que corresponde al LOD o al LOQ; puede también ser elegido como la señal producida por una concentración legal o aceptada de corte. Una población grande de muestras es entonces cribada mediante el nuevo análisis y por un método cuantitativo aceptado y validado. Cada muestra entonces se caracteriza como:

Positivo verdadero: Ambos métodos producen resultados positivos

Negativo verdadero: Ambos métodos producen resultados negativos

Falso positivo: Nuevo análisis positivo, análisis aceptado negativo

Falso negativo: Nuevo análisis negativo, análisis aceptado positivo

Para esta clasificación, se ha asumido y considerado que el método cuantitativo produce siempre los resultados correctos. El valor de corte predeterminado entonces es ajustado para reducir al mínimo o eliminar falsos negativos. Los análisis de cribado se utilizan en grandes poblaciones de muestras, a menudo para determinar qué muestras requieren una investigación adicional. Por esta razón, los falsos positivos no son tan problemáticos como los falsos negativos, puesto que serán examinados más a fondo posteriormente. Los falsos negativos, sin embargo, pueden resultar en diagnósticos incorrectos, con severas consecuencias.

16.6.1 Figuras de merito para ensayos cualitativos (cribado)

$$\begin{aligned} \text{Sensibilidad} &= \text{porcentaje de positivos identificados} \\ &= \frac{\text{Positivos verdaderos}}{\text{Positivos verdaderos} + \text{falsos negativos}} \times 100\% \end{aligned} \quad [16.31]$$

$$\begin{aligned} \text{Especificidad} &= \text{porcentaje de negativos identificados} \\ &= \frac{\text{Negativos verdaderos}}{\text{Negativos verdaderos} + \text{falsos positivos}} \times 100\% \end{aligned} \quad [16.32]$$

$$\begin{aligned} \text{Eficiencia} &= \text{porcentaje de resultados correctos} \\ &= \frac{\text{Positivos verdaderos} + \text{Negativos verdaderos}}{\text{Número total de muestras}} \times 100\% \end{aligned} \quad [16.33]$$

La sensibilidad se considera generalmente el más importante de estas figuras del mérito, porque es una indicación de la probabilidad de obtener resultados falsos negativos.

16.7 Ejemplos de los procedimientos de validación

16.7.1 Validación de un ensayo cualitativo para susceptibilidad a antibióticos⁵

Los laboratorios clínicos deben frecuentemente determinar qué tipo de antibióticos son efectivos para erradicar infecciones causadas por microorganismos aislados en la clínica médica. Un método aceptado para determinar la susceptibilidad a antibióticos implica el cultivo del microorganismo en una placa de agar en ausencia o presencia del antibiótico. El antibiótico se coloca en un pequeño disco de papel de filtro colocado en la superficie del agar. El crecimiento del cultivo (reproducción) ocurre durante un tiempo de incubación variable a 37°C. La ausencia de crecimiento, observable en forma de un anillo alrededor del disco de papel de filtro indica que el microorganismo es susceptible a ese antibiótico. Este método requiere por lo menos 8 h y puede requerir varios días, dependiendo de la velocidad de crecimiento del microorganismo.

En el nuevo método propuesto, los microorganismos suspendidos en un medio de cultivo líquido se incuban a 37°C por 20 minutos en ausencia o presencia de un antibiótico, usando

5. P. Ertl y S. R. Mikkelsen, U.S. Patent 6,391,577 BI, obtenida en mayo 21, 2002, y P. Ertl, E. Robello, F. Battaglini y S.R. Mikkelsen, *Anal. Chem.* **72**, 2000, 4957-4964.

la misma concentración de antibiótico que está presente en el método aceptado basado en el cultivo en placa de agar. La actividad respiratoria entonces es medida mediante un nuevo método electroquímico. Si la actividad respiratoria es menor que el 90% de la medida del control, realizado en ausencia del antibiótico, el microorganismo es susceptible al antibiótico. El nuevo método requiere solamente 25 minutos, y puede por lo tanto proporcionar resultados (y regímenes eficaces de tratamiento) mucho más rápidamente que el método aceptado.

La validación fue realizada usando una cepa común de laboratorio de *E. coli* con 13 antibióticos que poseían diversos mecanismos de acción, utilizando el método aceptado y el nuevo. La comparación de los resultados obtenidos para cada antibiótico permitió clasificar los resultados de la siguiente manera: Un *positivo verdadero* no muestra ningún crecimiento por el método de la placa de agar y su actividad respiratoria se encuentra disminuida en el método nuevo. Un *falso positivo* implica crecimiento en la placa de agar pero una respiración disminuida en el nuevo método. Un *negativo verdadero* implica crecimiento en agar, y ningún cambio o un aumento en la respiración. Finalmente, un resultado *falso negativo* ocurre si no hay crecimiento observable alrededor del disco de papel de filtro por el método de la placa de agar, mientras que el nuevo método no muestra ningún cambio o un aumento en actividad respiratoria. La Tabla 16.1 resume los resultados obtenidos en este experimento de validación.

Antibiótico	Resultado en agar	Resultado respiración	Resultado validación
Penicilina G	No crecimiento	Decrece	Verdadero positivo
D-Cicloserina	No crecimiento	Decrece	Verdadero positivo
Vancomicina	No crecimiento	Decrece	Verdadero positivo
Bacitracina	Crecimiento	Aumenta	Verdadero negativo
Cefalosporina C	No crecimiento	Decrece	Verdadero positivo
Tetraciclina	No crecimiento	Decrece	Verdadero positivo
Eritromicina	Crecimiento	Sin cambios	Verdadero negativo
Cloramfenicol	No crecimiento	Decrece	Verdadero positivo
Estreptomina	Crecimiento	Sin cambios	Verdadero negativo
Acido nalidíxico	No crecimiento	Decrece	Verdadero positivo
Rifampicina	No crecimiento	Decrece	Verdadero positivo
Trimetoprim	No crecimiento	Decrece	Verdadero positivo
Nistatina	Crecimiento	Sin cambios	Verdadero negativo

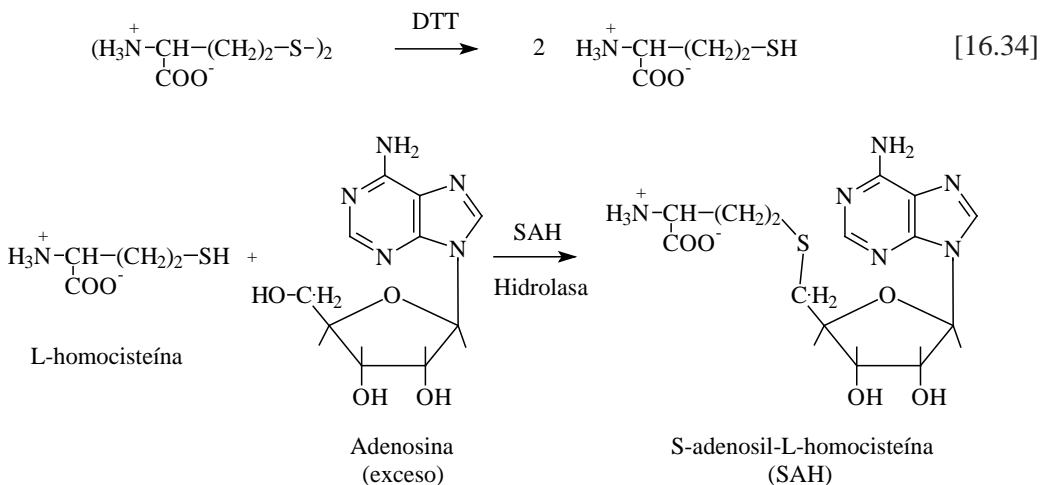
Tabla 16.1. Resultados de un ensayo de validación para una nueva prueba cualitativa de susceptibilidad a los antibióticos.

De los resultados presentados en la Tabla 16.1, tres parámetros pueden ser calculados: selectividad, sensibilidad y eficacia, según fuera definido en las Eqs. 16.31 - 16.33. En este ejemplo, los tres parámetros son iguales a 100%.

Antes de que pueda ser utilizado en un laboratorio clínico, esta clase de análisis debe recibir la aprobación de la correspondiente entidad reguladora. Se requieren datos producidos por varios laboratorios hospitalarios, donde numerosas cepas de microorganismos, así como un amplio rango de antibióticos son ensayados.

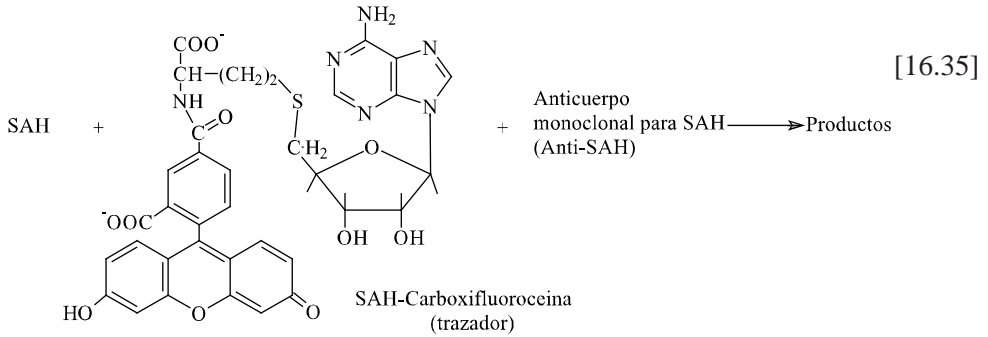
16.7.2 Medición de homocisteína en plasma mediante inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA)⁶

Las concentraciones elevadas de homocisteína en plasma (HCY) se relacionan con un riesgo elevado de sufrir enfermedad cardiovascular. HCY existe en varias formas en plasma, estando mayormente presente formando puentes disulfuro con otras moléculas de HCY, con la cisteína o la albúmina. Por lo tanto, el primer paso en el protocolo de medición implica el tratamiento de la muestra con un agente reductor, en este caso ditioneitol (DTT), para obtener HCY en su forma libre (Eq. 16.34). Algunos aminoácidos (como por ejemplo L-cisteína y L-metionina) están presentes en el plasma humano en concentraciones molares más elevadas que la HCY y pueden interferir con este análisis. Para evitar esta posible interferencia, la conversión enzimática altamente selectiva de HCY al S-adenosil-L-homocisteína (SAH) es utilizada, según puede observarse en la Eq. 16.34. Ambas reacciones (reducción y conjugación) se alcanzan en 30 minutos de incubación a 34°C.



Un anticuerpo monoclonal fue producido contra SAH, y utilizado en una reacción competitiva donde el anticuerpo puede unirse a SAH o bien a un análogo fluorescente de SAH (trazador), en una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente, según se muestra en la Eq. 16.35.

6. M.T. Shipchandler y E.G. More, *Clinical Chemistry* **41**, 1995, 991-994.



La polarización de fluorescencia (P) fue calculada a partir de los valores medidos de fluorescencia según la Eq. 16.36, donde $F_{//}$ es la intensidad de fluorescencia paralela al plano de la excitación, y F_{\perp} es la intensidad de fluorescencia perpendicular al plano de la excitación.

$$P = \frac{(F_{//} - F_{\perp})}{(F_{//} + F_{\perp})} \quad [16.36]$$

Una curva de calibración fue construida utilizando cinco concentraciones de HCY y una solución blanco, y la curva no lineal obtenida (Figura 16.9) fue utilizada para calcular las concentraciones de las muestras incógnitas.

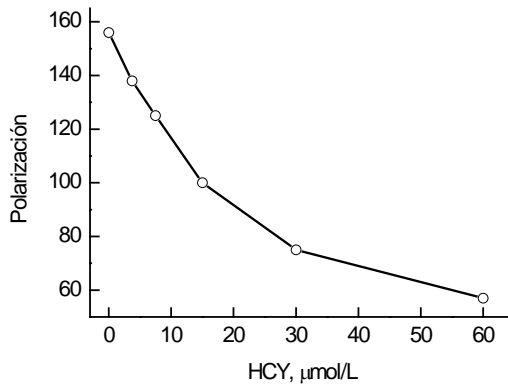


Figura 16.9. Curva de calibración basada en determinaciones de estándares de HCY. Reproducido, con permiso, de Mohammed T. Shipchandler y Ewin G. Moore. *Clinical Chem.* **41**:7, 1995, 991-994. “Rapid, Fully Automated Measurement of Plasma Homocyst(e)ine with the Abbot Imx Analyzer”. © Amer. Assos. for Clinical Chemistry.

Los coeficientes de variación para las curvas de calibración obtenidas en experimentos intra-laboratorio e inter-laboratorio se exponen en la Tabla 16.2.

Estándar, μmol/L	CV	
	Intra-ensayo (n = 3)	Inter-ensayo (n = 3)
3,75	8,0	9,1
7,50	3,6	4,5
15,00	3,4	6,5
30,00	2,7	3,0
60,00	1,8	2,6

Tabla 16.2. Coeficientes de variación para experimentos intra-análisis e inter-análisis para los datos de calibración del análisis para homocisteína en plasma. Reproducido, con permiso, de Mohammed T. Shipchandler y Ewin G. Moore. *Clinical Chem.* **41**:7, 1995, 991-994. "Rapid, Fully Automated Measurement of Plasma Homocyst(e)ine with the Abbot Imx Analyzer". © Amer. Assos. for Clinical Chemistry.

Los efectos de la matriz fueron estudiados por dilución con solución tampón de dos muestras auténticas de plasma. Ambas pruebas de paralelismo (Tabla 16.3) demuestran que los efectos de la matriz no son significativos para este método, puesto que el cociente de resultados observados / calculados muestran una dispersión al parecer al azar alrededor del 100%

Tampón:Plasma (relación volumen)	HCY, μmol/L		Obs. × 100% Calculado
	Observado	Calculado	
<i>Plasma 1</i>			
0:1	47,51	47,51	100,0
1:3	33,78	35,63	94,8
1:2	32,74	31,64	103,5
1:1	25,29	23,76	106,5
3:1	12,79	11,88	107,7
7:1	6,82	5,94	114,8
		Media (SD)	104,5 (6,9)
<i>Plasma 2</i>			
0:1	40,40	40,40	100,0
1:3	29,14	30,30	96,2
1:2	----	----	----
1:1	19,48	20,20	96,4
3:1	10,09	10,10	99,9
7:1	5,13	5,00	102,6
		Media (SD)	99,0 (2,7)

Tabla 16.3. Paralelismo, ensayado en dos muestras reales de plasma (*Plasma 1* y *Plasma 2*) diluidas con solución tampón. Reproducido, con permiso, de Mohammed T. Shipchandler and Ewin G. Moore. *Clinical Chem.* **41**:7, 1995, 991-994. "Rapid, Fully Automated Measurement of Plasma Homocysteine with the Abbot Imx Analyzer". © Amer. Assos. for Clinical Chemistry.

Otro método utilizado para estudiar los efectos de la matriz es el experimento de recuperación. La Tabla 16.4 muestra que la recuperación está dentro de límites aceptables, puesto que los valores calculados se dispersan otra vez cerca del 100%.

HCY, $\mu\text{mol/L}$			
Agregado	Calculado	Observado	Recuperación, %
<i>Plasma 1</i>			
Ninguna	----	7,29	----
0,00	6,07	6,05	99,7
3,75	6,70	5,77	86,1
7,50	7,32	7,20	92,5
15,00	8,57	7,93	107,7
30,00	11,07	10,56	95,4
60,00	16,07	16,36	101,8
120,00	26,07	27,56	105,7
		Media (SD)	97,7 (6,4)
<i>Plasma 2</i>			
Ninguna	----	16,20	----
0,00	13,50	13,56	100,4
3,75	14,13	14,50	102,6
7,50	14,75	14,77	100,1
15,00	16,00	15,35	95,9
30,00	18,50	18,55	100,3
		Media (SD)	99,9 (2,4)

Tabla 16.4. Recuperación de L-homocisteína agregada a muestras de plasma. Reproducido, con permiso, de Mohammed T. Shipchandler y Ewin G. Moore. *Clinical Chem.* **41**:7, 1995, 991-994. "Rapid, Fully Automated Measurement of Plasma Homocysteine with the Abbot Imx Analyzer". © Amer. Assos. for Clinical Chemistry.

La reactividad cruzada fue estudiada para las moléculas similares que se esperaba estuvieran presentes en plasma. L-cisteína (clorhidrato) y L-metionina en concentraciones de 5 y 4,5 mmol/L, respectivamente, fueron ensayadas en solución tampón. Los valores de polarización observados corresponden a concentraciones equivalentes de HCY de 0,0 y 0,1 mmol/L, respectivamente. Por ello, puede establecerse que la reacción de unión del anticuerpo es suficientemente selectiva aún en presencia de estas potenciales interferencias.

La exactitud fue determinada por comparación con métodos establecidos. Las ecuaciones de regresión fueron determinadas para las muestras clínicas analizadas por este nuevo método así como para cuatro métodos ampliamente aceptados para la cuantificación de HCY.

Los resultados de este nuevo método fueron graficados como valores de x y los resultados obtenidos utilizando los métodos aceptados fueron graficados como valores de y . La Tabla 16.5 muestra las ecuaciones de regresión y sus parámetros estadísticos de calidad.

Método	Ecuación	r	s_y	n
A	$y=1,030x + 0,184$	0,980	1,183	42
B	$y=1,212x - 0,319$	0,995	0,457	10
C	$y=1,119x + 0,167$	0,996	0,557	8
D	$y=1,493x - 1,145$	0,997	0,877	21

Tabla 16.5. Exactitud del análisis de HCY, determinada por comparación de resultados de muestras clínicas con los resultados obtenidos por métodos establecidos (A a D), realizada en distintos laboratorios.

Los coeficientes de correlación (r) obtenidos entre los métodos ensayados son buenos, aunque las diferencias de pendientes son grandes, indicando una sobrestimación de la concentración de HCY por los métodos B-D, o bien la subestimación de las concentraciones de HCY por el método A y el nuevo método. Los autores creen que estas diferencias se pueden atribuir a la desigual pureza de los distintos estándares comerciales (HCY) usados en diferentes laboratorios.

El uso de materiales de referencia estándares, según se indico previamente en este Capítulo, permitiría una mejor cuantificación de la exactitud del nuevo método. Sin embargo, para muchos analitos biológicos, estos materiales no están disponibles. Bajo estas condiciones, una comparación de resultados obtenidos utilizando distintos métodos, como se ha descrito, es apropiada.

16.7.3 Determinación de la actividad enzimática de β -Galactosidase⁷

La lacasa neutral (β -Galactosidasa) es una enzima producida a escala industrial, que cataliza la hidrólisis de la lactosa. La industria utiliza esta enzima en la producción de productos lácteos bajos en lactosa, en el tratamiento del suero lácteo y en productos lácteos fermentados. El objetivo de este estudio es demostrar que un nuevo método colorimétrico para medir la actividad enzimática es adecuado para ser utilizado como método estándar.

El método es propuesto para ser aplicable a disoluciones de laccasa de entre 2000-5000 unidades/g, donde una unidad enzimática es definida como la cantidad de enzima que libera 1,30 μ moles de *o*-nitrofenol/min en las condiciones de ensayo. La lacasa descompone el sustrato artificial *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido en *o*-nitrofenol y galactosa.

7. A.J. Engelen y P.H.G Randsdorp, *Journal of AOAC International* **82**, 1999, 112-118.

La absorbancia del *o*-nitrofenol (amarillo en disolución alcalina) se mide para estimar la actividad enzimática, a 420 nm.

Trece laboratorios participaron en este estudio; cada uno recibió el protocolo completo incluyendo instrucciones exactas sobre la preparación y el almacenaje de cada reactivo, muestras de prueba para calibrar el procedimiento antes de comenzar el estudio inter-laboratorio, y 5 muestras duplicadas cuya concentración no era conocida por los laboratorios participantes (blind samples). El número relativamente bajo de muestras es debido al hecho de que solamente dos concentraciones (2000 y 5000 unidades/g) fueron probadas en este estudio.

Los datos recibidos de tres laboratorios fueron excluidos del análisis estadístico debido a que los tres informaron una actividad enzimática baja (menor el 50% de los valores previstos), debido a errores cometidos durante el procesado de las muestras. Por ejemplo, el laboratorio "J" realizó el pretratamiento de las muestras durante 4 días, ensayando la actividad durante el 5^o día, causando esto una pérdida significativa de actividad enzimática. Dos laboratorios no entregaron resultados. Los análisis estadísticos fueron conducidos usando los datos producidos por los participantes restantes; los resultados se presentan en la Tabla 16.6.

Laboratorio	Muestras				
	1 + 10	2 + 7	3 + 8	4 + 6	5 + 9
A	4401, 4343	1680, 1655	1716, 1690	4583, 4385	1586, 1542
B	5278, 5591	2232, 2139	2280, 2347	5386, 5340	2004, 2024
C	4522, 4569	1821, 1825	1870, 1874	4879, 4638	1718, 1649
D	5040, 5099	1903, 1856	1955, 2059	5113, 5037	1780, 1706
E	5320, 5097	2086, 2036	2107, 2088	5405, 5340	1924, 1884
F	5404, <u>5533</u>	2125, 2108	2189, 2146	5470, 5472	1959, 1940
G	5462, 5246	2249, 2099	1980, 2114	5329, 5250	2012, 1916
H	4925, 4765	1693, 1838	<u>1356</u> , <u>1569</u>	<u>4022</u> , 5066	1834, 1578
Media	5031	1959	1959	5044	1816
RSD _p , %	3,20	3,75	8,62	7,53	5,01
RSD _R , %	8,77	10,83	16,35	10,88	10,26

Tabla 16.6. Comparación inter-laboratorio de los resultados para la determinación de la actividad de β -Galactosidasa expresada en NLU/g. En las muestras 1, 4, 6 y 10, la actividad prevista (concentración "real") es de 5000 NLU/g, mientras que en el resto de las muestras la actividad prevista es de 2000 NLU/g. Los datos presentados son promedios de dos muestras réplicas. Los datos subrayados fueron identificados como "anómalos" ("outliers") y no fueron utilizados posteriormente en otros cálculos. Valores de precisión intra-laboratorio (RSD_p) y valores inter-laboratorio (RSD_R) también son presentados. Reproducido, con permiso, de A.J. Engelen y P.H.G Randsdorp, *Journal of AOAC International* **82** No 1, 1999, 112-118. "Determination of Neutral Lactase Activity in Industrial Enzyme Preparations by a Colorimetric Enzymatic Method: Collaborative Study". © 1999

by Association of Official Analytical Chemists.

El análisis de los datos presentado en la Tabla 16.6 permite rechazar datos anómalos (outliers) utilizando pruebas estadísticas, dando lugar a una mejor precisión, desde 2,94 a 5,01 (RSD_r) y desde 7,50 a 13,84 (RSD_r). Estos parámetros de precisión se consideran aceptables, y esta validación preliminar del método colorimétrico por lo tanto es considerada exitosa.

16.7.4 Establecimiento de un valor de corte para un análisis semi-cuantitativo para cannabinoides⁸

Cuando las drogas del abuso u otras sustancias prohibidas son investigadas, se utiliza a menudo un procedimiento de dos etapas. En el primer paso, los especímenes son estudiados mediante un análisis semi-cuantitativo; los especímenes determinados como positivo en este paso son examinados luego por un análisis confirmativo, de tipo cuantitativo, en un segundo paso. El segundo método utiliza generalmente un principio analítico diferente, para reducir el impacto potencial de especies interfrentes (tales como sustancias que presentan reactividad cruzada en inmunoensayos). El primer análisis debe ser altamente sensible e identificar muestras presuntamente positivas y eliminar falsas negativas, mientras que el segundo, un método cuantitativo, debe ser altamente específico y eliminar resultados falsos positivos.

En este ejemplo, especímenes de orina provenientes de 6 individuos masculinos sanos con una historia de uso de marihuana, que se encontraban bajo tratamiento médico, fueron estudiados inicialmente usando ocho inmunoensayos semi-cuantitativos para cannabinoides (Tabla 16.7). En estos análisis, el metabolito 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) fue detectado. El efecto de dos distintos valores de corte (100 y 50 $\mu\text{g/L}$ THCCOOH) fue investigado con respecto a la sensibilidad, especificidad y eficacia, según fueron definidas previamente en las Eq. 16.31-16.33. En este estudio, todos los especímenes fueron también ensayados por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS), como método confirmativo cuantitativo, usando un valor de corte de 15 $\mu\text{g/L}$; este valor fue utilizado para definir resultados del ensayo positivos y negativos (≥ 15 y < 15 $\mu\text{g/L}$, respectivamente).

Los especímenes positivos verdaderos fueron definidos como aquellos cuyos resultados en el inmunoensayo sean iguales o mayores que la concentración de corte especificada (100 o 50 $\mu\text{g/L}$) y ≥ 15 $\mu\text{g/L}$ para el ensayo por GC/MS, en THCCOOH. Los especímenes negativos verdaderos son aquellos de menor concentración que la de corte para los inmunoensayos y el ensayo por GC/MS. Las muestras falsas positivas producen resultados por inmunoensayo mayores o iguales que la concentración de corte para el inmunoensayo y < 15 $\mu\text{g/L}$ cuando son medidas mediante GC/MS, para el analito THCCOOH. Los falsos negativos tienen valores por inmunoensayo menores que el valor especificado de corte, y ≥ 15 $\mu\text{g/L}$ cuando medidos por GC/MS, en THCCOOH.

8. M.A. Huestis, J.M. Mitchell y E.J. Cone, *Clinical Chemistry* **40**, 1994, 729-733.

	Número de resultados						Figuras de mérito, %							
	Verd. positivos		Verd. negativos		Falsos positivos		Falsos negativos		Sensibilidad		Especificidad		Eficiencia	
	100 ^a	50 ^b	100 ^a	50 ^b	100 ^a	50 ^b	100 ^a	50 ^b	100 ^a	50 ^b	100 ^a	50 ^b	100 ^a	50 ^b
Ensayo	76	120	790	796	16	37	75	31	50,3	79,5	98,0	95,4	90,5	92,9
Emit d.a.u. 100	51	94	800	788	6	18	100	57	33,8	62,3	99,3	97,8	88,9	92,2
Emit II 100	47	112	802	794	4	12	104	39	31,1	74,2	99,5	98,5	88,7	94,7
Abuscreen Online	37	91	806	794	0	12	114	60	24,5	60,3	100,0	98,5	88,1	92,5
Abuscreen RIA	40	86	802	789	4	17	111	65	26,5	57,0	99,5	97,9	88,0	91,4
DRI	31	112	802	787	4	19	120	39	20,5	74,2	99,5	97,6	87,0	93,9
ADx	111	780	780	26	40	73,5	96,8	93,1						
Emit d.a.u. 50	101	787	787	19	50	66,9	97,6	92,8						
Emit II 50	47	103,4	800,3	786,0	5,7	20,0	104,0	47,6	31,1	68,5	99,3	97,5	88,5	92,9
Media	15,9	13,9	5,4	9,2	5,4	9,2	15,9	13,9	10,5	9,2	0,7	1,1	1,2	1,2
SD														

Tabla 16.7. Características de performance de los inmunoensayos para la detección de cannabinoides en orina. ^aValor de corte de concentración de 100 µg/L para inmunoensayo, 15 µg/L para GC/MS. ^bValor de corte de 50 µg/L para inmunoensayo, 15 µg/L para GC/MS. Reproducido, con permiso, de M.A. Huestis, J.M. Mitchell y E.J. Cone, *Clinical Chemistry* **40** No 5, 1994, 729-733. "Lowering the Federally Mandated Cannabinoid Immunoassay Cutoff Increases True-Positive Results". © 1994 by American Asso. of Clinical Chem.

En este estudio, a partir de 957 especímenes analizados, los resultados de GC/MS indican 151 resultados positivos y 806 negativos. Estos se comparan con resultados obtenidos por inmunoensayos en la Tabla 16.7. Este estudio concluyó que bajando la concentración de corte para cannabinoides de 100 a 50 $\mu\text{g/L}$ de THCCOOH aumentó el porcentaje de especímenes correctamente identificados en todos los tests basados en inmunoensayos utilizados. Por lo tanto, las sensibilidades de todos los inmunoensayos fueron mejoradas, dando por resultado una eficacia mejorada para estos análisis. Según lo esperado, la especificidad disminuyó levemente cuando el valor de corte más bajo (50 $\mu\text{g/L}$) fue utilizado. Es también evidente de los resultados presentados en la Tabla 16.7 que hay discrepancias entre los resultados de los ocho inmunoensayos comerciales. Las pruebas preliminares sugieren que estas discrepancias se pueden atribuir a las diferencias en la selectividad de los anticuerpo utilizados, puesto que distintos anticuerpos son utilizados en diferentes análisis; estos anticuerpos es esperable que presente diversas reactividades cruzadas con otros metabolitos de tipo canabinoide, así como de otras especies interferentes.

16.8 Lecturas sugeridas

- J.C. Miller y J.N. Miller, “*Statistics for Analytical Chemistry*”, Ellis Horwood PTR Prentice Hall, New York, 1993.
- G.T. Wernimont, “*Use of Statistics to Develop and Evaluate Analytical Methods*”, W. Spendley Ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA, 1985.
- R. Caulcutt y R. Boddy, “*Statistics for Analytical Chemists*”, Chapman and Hall, London, 1983.
- A. Fajgelj y A. Ambrus, Eds. “*Principles and Practices of Method Validation*”. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2000.
- M.L. Bishop, J.L. Duben-Engelkirk, E.P. Fody, “*Clinical Chemistry*”, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000.
- D.C. Harris, “*Quantitative Chemical Analysis*”, W.H. Freeman and Company, New York, 2002.

RESPUESTAS A LOS PROBLEMAS

Capítulo 1

1. Es probable que interferencias (agentes que puedan reducir al Cu^{2+} , posiblemente azúcares reductores) estén presentes en el primer análisis de Lowry; la oxigenación completa de la disolución oxida estas especies, de modo que no interfieran en el segundo análisis.
2. Las sensibilidades de estos métodos se relacionan con composición de aminoácidos de las proteínas estándares y las incógnitas, entre otros factores que incluyen la exposición de residuos particulares, lo que afecta sus reactividades. Además, las glicoproteínas reaccionan a menudo diferentemente con los reactivos de análisis que las proteínas que carecen un componente polisacárido. Por lo tanto, cuando se hacen las curvas de calibración usando distintas proteínas estándares, sus pendientes son diferentes. La elección de la proteína estándar determinará si es que la cantidad de proteína total en la muestra incógnita será subestimado o sobreestimado.
3. Después de la corrección por dilución, el método del ferrocianuro informa $18 \pm 3 \mu\text{g/mL}$. Esta concentración de carbohidratos producirá una señal en el análisis de DABA que es equivalente a $33 \mu\text{g/mL}$ de DNA ($18 \times 330/180$). La señal restante en el análisis de DABA es debido al DNA; su concentración es por lo tanto $\approx 11 \mu\text{g/mL}$. Un análisis de unión a colorantes (pro ejemplo bromuro de etidio) puede ser utilizado como método confirmatorio.

Capítulo 2

1. (a) Dos sustratos, dado que el agua es 55 M y no cambia su concentración.
(b) $[\text{NAD}^+]$ debe ser mayor que $10K_m$ para NAD^+ , esto es, $> 2,2 \text{ mM}$; linealidad debería ser observada entre $0-1,7 \text{ mM}$ ($0,1K_m$ para alanopina).
(c) NAD^+ es un inhibidor competitivo. El K_m aparente para NADH es superior en presencia de NAD^+ agregado que en su ausencia; la V_{max} no fue afectada.
2. (a) Requiere una disolución enzimática de una concentración de $0,5 \text{ I.U./L}$, entonces para 100 mL se necesitan $0,05 \text{ I.U.}$; basándose en la actividad específica de la enzima, podemos calcular $0,05 \text{ I.U./700 I.U./mg} = 70 \text{ ng}$ de enzima.
(b) Utilizando la actividad específica y el MW se encuentra que $(700 \text{ I.U./mg})(1000 \text{ mg/g})(45000 \text{ g/mol}) = 3,15 \times 10^{10} \text{ I.U./mol} = 3,15 \times 10^4 \text{ mol de sustrato}/(\text{min} \times \text{mol enzima})$; transformando min a seg se obtiene $k_{\text{cat}} = 525 \text{ s}^{-1}$.

(c) $0,32 \text{ I.U./L} \times (2 \text{ mL}/0,5 \text{ mL}) = 1,28 \text{ I.U./L}$; $1,28 \text{ I.U./L} \times 0,1 \text{ L} = 0,128 \text{ I.U.}$; $0,128 \text{ I.U.}/1,6 \text{ mg} = 0,080 \text{ I.U./mg}$.

3. La preparación enzimática tiene 20 ng/mL ($2,0 \times 10^{-5} \text{ mg/mL}$) de material disuelto, por lo que tiene 16 I.U./mg , así que la actividad de esta solución es $2,0 \times 10^{-5} \times 16 = 3,2 \times 10^{-4} \text{ I.U./mL}$, o $0,32 \text{ I.U./L}$. Esta solución convierte $0,32 \text{ } \mu\text{M}$ de sustrato por minuto. De la ley de Beer calculamos $A = (2,15 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})(1 \text{ cm})(3,2 \times 10^{-7} \text{ M/min}) = 0,0069 \text{ AU/min}$.
4. Método de Eadie-Hofstee: Grafique v respecto a $v/[S]$, pendiente = $-K_m$, que corta el eje y en V_{\max} . Los valores obtenidos por la regresión lineal son $K_m = 0,62 \text{ mM}$ y $V_{\max} = 0,74 \text{ } \mu\text{mol/min}$, con $R = -0,996$, usando los datos presentados abajo:

v	0,648	0,488	0,418	0,353	0,310	0,275
$v/[S]$	0,162	0,365	0,523	0,621	0,692	0,747

Método de Cornish-Bowden-Eisenthal: cada par de puntos v , $v/[S]$ mostrados arriba produce una ecuación para una línea recta, de acuerdo a $V_{\max} = v + (v/[S])K_m$. Entonces, las seis ecuaciones son:

$$\begin{aligned} V_{\max} &= 0,648 + 0,162 K_m & [1] \\ V_{\max} &= 0,488 + 0,365 K_m & [2] \\ V_{\max} &= 0,418 + 0,523 K_m & [3] \\ V_{\max} &= 0,353 + 0,621 K_m & [4] \\ V_{\max} &= 0,310 + 0,692 K_m & [5] \\ V_{\max} &= 0,275 + 0,747 K_m & [6] \end{aligned}$$

Cada par de ecuaciones entonces es utilizada para calcular V_{\max} y K_m (2 ecuaciones / 2 incógnitas), para obtener $5+4+3+2+1 = 15$ valores para cada uno. Estos valores son:

V_{\max} : 0,776; 0,751; 0,753; 0,753; 0,752; 0,652; 0,683; 0,691; 0,694; 0,770; 0,763; 0,756; 0,750; 0,741; 0,727 (Avg \pm SD = $0,73 \pm 0,04 \text{ } \mu\text{M/min}$).

K_m : 0,788; 0,637; 0,643; 0,638; 0,638; 0,443; 0,527; 0,554; 0,558; 0,663; 0,639; 0,638; 0,606; 0,619; 0,636 (Avg \pm SD = $0,62 \pm 0,08 \text{ mM}$).

El método de C-B-E es el que tiene mejores probabilidades de producir mejores estimaciones de K_m y V_{\max} .

Para encontrar k_{cat} , nosotros usamos los valores de V_{\max} determinados por el método de C-B-E y una concentración de enzima de: $(0,73 \text{ } \mu\text{M sustrato/min})/0,050 \text{ } \mu\text{M enzima} = 15 \text{ min}^{-1} = 0,25 \text{ s}^{-1}$.

5. La curva de Hanes produce pendientes de $1/V_{\max}$ que cortan al eje y en K_m/V_{\max} . Entonces, para los valores dados, $V_{\max} = 0,0100 \text{ } \mu\text{M/min}$ y $K_m = 2,0 \times 10^{-5} \text{ } \mu\text{M}$, o 20 pM . La actividad específica es calculada utilizando $V_{\max} = 0,0100 \text{ I.U./L}$, dado que la concentración de enzima es 10 ng/mL (o sea, $0,010 \text{ mg/L}$): $(0,0100 \text{ I.U./L})/(0,010 \text{ mg/L}) = 1,0 \text{ I.U./mg}$.

Capítulo 3

1. El método cinético requiere $[S] < 0,1 K_m$ puesto que se miden las velocidades iniciales, y éstas dependen linealmente de la $[S]$ solo bajo estas condiciones.

2. Para la medición de un sustrato, $[S] < 0,1 K_m$, y para un ensayo de actividad enzimática, $[S] > 10 K_m$.
3. Los límites de detección serían mejorados considerablemente (más bajos) si la reacción del indicador generara un inhibidor de una reacción enzimática que produjera un fluoróforo, debido a la amplificación catalítica adicional proporcionada por esta reacción.
- 4.(a) Solamente la primera reacción es crítica para el análisis de AP. Las otras tres reacciones son reacciones del indicador que se podrían utilizar con cualquier reacción primaria que produjera FAD.
 (b) $0,1 \mu\text{mol sustrato/L convertidos en } 10 \text{ min} = 1 \times 10^{-5} \mu\text{mol}/(\text{min mL}) = 1 \times 10^{-5} \text{ I.U./mL}$.
 (c) Calcule $V_{\text{max}} = (3,2 \text{ s}^{-1})1,2 \times 10^{-8} \text{ M enzima} = 4,32 \times 10^{-8} \text{ M/s}$; luego de 10 min (600 s), $4,32 \times 10^{-8} \text{ M/s} \times 600 \text{ s} = 2,59 \times 10^{-5} \text{ M}$ de sustrato han sido catalizados. Dado que una estequiometría 1:1 prevalece, el cambio de absorbancia es $(2,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})(1\text{cm})(2,59 \times 10^{-5} \text{ M}) = 0,60 \text{ AU}$.
 (d) En el ensayo de actividad, $1,2 \times 10^{-8} \text{ M}$ de enzima debería producir un cambio en la absorbancia de 0,3 AU. Asumiendo un relación lineal entre ΔA y $[S]$, $0,4 \times 10^{-8} \text{ M}$ de enzima deberían producir 0,1 AU, y $8,0 \times 10^{-8} \text{ M}$ deberían dar 2,0 AU. El rango dinámico apropiado del ensayo para la fosfatasa alcalina es entonces $0,004 - 0,080 \mu\text{M}$. Dado que $k_{\text{cat}} = 3,6 \text{ s}^{-1}$ (o 216 min^{-1}), y $V_{\text{max}} = k_{\text{cat}}[E]$, los valores de V_{max} varían entre $0,86 \mu\text{M}/\text{min}$ a $17 \mu\text{M}/\text{min}$. Estos valores pueden transformarse en $8,6 \times 10^{-4}$ y $1,7 \times 10^{-2} \text{ I.U./mL}$.
5. Utilizando la ley de Beer, $[\text{ABTS}]_{\text{ox}} = 0,174 \text{ AU}/(3,48 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}) = 5,00 \times 10^{-6} \text{ M}$. La estequiometría de AG:ABTS es 1:1, entonces, tomando en cuenta la dilución, originalmente la $[\text{AG}]$ fue $5,00 \times 10^{-5} \text{ M}$. Transformando las unidades, $[\text{AG}] = 8,20 \text{ mg/mL}$, indicando que el paciente es diabético.

Capítulo 4

1. Los pasos consisten en la activación del material soporte, la unión de la enzima y el empaqueo de la columna. El poliestireno debe primero ser activado para generar grupos funcionales convenientes para la inmovilización. Esto requiere la nitración, reducción y diazotación en el paso de activación. El paso siguiente de acoplado para inmovilizar la enzima consiste entonces en colocar el material soporte activado en una disolución tampón conteniendo colesterol oxidasa. Después de este paso de acoplamiento en condiciones “suaves”, las partículas de poliestireno se filtran, se lavan y se empaquen en una columna. La colesterol oxidasa, como otras enzimas de este tipo (oxididasas), genera peróxido de hidrógeno que puede ser detectado amperométricamente a $+0,7 \text{ V}$ respecto SCE. Si se desea utilizar un detector de absorbancia, la enzima peroxidasa debe ser coimmobilizada con la colesterol oxidasa, y un reactivo adecuado debe ser incluido en la fase móvil, de manera que la reacción genere un producto coloreado.
- 2.(a) Este copolímero rinde grupos residuales carboxilato después de la inmovilización. La carga negativa atrae contraiones incluyendo H^+ , de modo que el pH local en la superficie de las partículas es más bajo que el pH en el seno de la disolución. Esto significa que el pH óptimo aparente será más alto para la enzima inmovilizada que para la enzima en disolución homogénea. Esto se aplica a cualquier enzima inmovilizada en copolímeros de anhídrido etilénico/málico.
 (b) Debido a la capa de difusión en la superficie de la partícula, el K_m aparente para la urea será más grande que el K_m homogéneo. Igualmente, esto es cierto para cualquier enzima inmovilizada.

- 3.(a) Este es un método físico de inmovilización. La enzima se atrapa entre membranas, pero no está unida químicamente. El efecto de esta inmovilización en el K_m podría ser un leve aumento (el K_m nunca es más bajo para las enzimas inmovilizadas), pero no se espera que el pH óptimo cambie. En efecto, la enzima existe en la disolución que se encuentra entre las membranas, pero no está químicamente unida a la superficie. Los métodos físicos de inmovilización tienen menos efecto sobre el K_m y el pH óptimo que los métodos químicos.
- (b) La respuesta aumenta linealmente con la [acetilcolina], luego llega a un máximo y se mantiene estable a altas. El K_m se encuentra a la mitad de la respuesta máxima.
- (c) Iguales que en la Figura 2.12.
- 4.(a) Los grupos silanol son derivatizados usando APTS, dando lugar a grupos amina primarios. Estos se pueden hacer reaccionar directamente con los grupos carboxilato de la proteína, usando un reactivo deshidratante como la reacción de carbodiimina/NHS; alternativamente, las aminas primarias se pueden diazotizar, y después hacerlas reaccionar con los residuos de la proteína.
- (b) De la Ecuación 4.23, capacidad $C = kE_T\beta = \{(1,45 \times 10^3 \text{ s}^{-1})(0,3 \text{ g enzima})/(5 \times 10^4 \text{ g/mol})\} \times (3 \text{ mL}/5\text{mL}) = 3,5 \times 10^{-3} \text{ mol s}^{-1} = 0,21 \text{ mol min}^{-1}$.
- (c) De la Ecuación 4.24, substituya $C = 0,21 \text{ mol min}^{-1}$, $P = 0,95$ y los valores dados de K_m . Usando el valor homogéneo del K_m , caudales máximos de $1,2 \times 10^4$, $1,2 \times 10^4$ y $9,2 \times 10^3 \text{ L/min}$ son obtenidos con los valores dados (esta columna tiene una capacidad extremadamente grande).

Capítulo 5

1. La preparación A es más concentrada, puesto que debe ser diluida a un grado mucho mayor para alcanzar el extremo de baja concentración de la zona de equivalencia / aglutinación.
2. Las preparaciones de anticuerpos monoclonales contienen una población homogénea de moléculas idénticas del anticuerpo con sitios de unión también idénticos. Por ello poseen interacciones bien definidas entre este sitio y un solo epítipo del antígeno. Esto da lugar a un diagrama lineal de Scatchard. Las preparaciones policlonales consisten en una mezcla de moléculas de anticuerpo, donde algunas de ellas reaccionan con el antígeno. Los que se unen al antígeno poseen un número de paratopos diferentes, de modo que una variedad de epítopos del antígeno se unen a ellos, cada uno con una afinidad diferente. Esto da lugar a un diagrama de Scatchard curvado.
- 3.(a) No se forma precipitina. Anti-B, -C, o -D deben estar también presentes para obtener precipitina.
 - (b) Precipitina está presente dado que el antígeno es polivalente.
 - (c) No se forma precipitina porque solo la reacción Ag:Ab primaria puede ocurrir.
 - (d) Se forma precipitina (mismo argumento que para (b)).
4. Sí, la bacteria estaba presente, puesto que se observó una zona de aglutinación. Una prozona se observa solamente si el antígeno está presente en exceso, en el extremo de baja dilución (concentrada) de la serie de dilución; puesto que no se observó ninguna prozona, la bacteria estaba inicialmente presente en una concentración demasiado diluida para la observación de una prozona.
5. La línea de precipitina se curvaría hacia el pocillo del antígeno.

Capítulo 6

1. (a) estrógeno, (b) α -fetoproteína humana, (c) anticuerpo de ratón, y (d) acetilcolina.
2. (a) anticuerpo, (b) anticuerpo, y (c) ligando marcado y ligando / incógnita.
3.

Fluoróforo	Continuo
Quimioluminiscente	Evento simple (esto es, 1 fotón / reacción)
Enzima	Amplificación catalítica
Cofactor	Continuo (como sustrato)
Agente de lisis	Amplificación catalítica (E inmovilizado)
Marca secundaria	Amplificación catalítica (se une a E)
Grupo prostético	Amplificación catalítica (origina E activo)
Electroactivo	Evento simple (esto es, 1 electrón / ferroceno)
Marca de espin	Continuo
Sustrato	Continuo (A del producto)
4. (a) El Ab está presente en concentración limitante, mientras que H, H-H y Ab* están presentes en exceso.
 (b) Solamente otra especie estará presente, Ab-H.
 (c) De estas potenciales interferencias, se espera que E tenga una reacción cruzada más importante, debido a que es el más parecido a C, especialmente en una región que muy probablemente abarque al epítipo. D es menos probable que interfiera, puesto que es diferente en la región de unión al Ab.
 (d) El diagrama es sigmoideo, con las señales altas a bajas [testosterona] y disminuyendo a medida que aumenta la concentración.
5. (a) El diagrama es sigmoideo, con señales más altas en los valores bajos de [biotina libre], disminuyendo a medida que aumenta la [biotina].
 (b) [Sustrato] > 1,0 mM debe ser utilizado ($10 K_m$).
 (c) Idealmente, el esquema de la intensidad de luz, o fotones detectados, en función del tiempo será plano, es decir que los fotones se emiten y detectan a una velocidad constante. En contraste, los productos absorbentes se acumulan en una reacción enzimática, de modo que la absorbancia aumenta con el tiempo.
6. Este análisis es no-competitivo, de manera que se observan diagramas lineales de emisión-concentración (y no emisión- $\log[Ag]$ sigmoideos). Diagramas lineales log-log también serán observados, y según lo presentado en la Figura 6.6, la emisión de F1 disminuye con el aumento de la concentración mientras que la emisión de F2 aumenta con el aumento de Ag.

Capítulo 7

1. (a) $i = 26 \mu A$; no olvidar de convertir cm^3 a L.
 (b) Mismo que (a) – la corriente no cambia.
2. La suposición es inválida cuando se utilizan volúmenes de muestra muy pequeños. Entonces el analito se consume, y la concentración del analito en la capa de reacción disminuye con el tiempo.

3. Quisiéramos que el NADPH fuera producido muy cerca de la superficie de la fibra óptica, de modo que la onda evanescente lo detecte. La opción (a) no es la mejor, puesto que la adsorción podría producir una pérdida de actividad, y la monocapa tendría una baja actividad total. La opción (c) también produce una monocapa, y puede no convertir completamente la glucosa (es decir, $[S]_0$ no sería igual a 0). La opción (b) parece la mejor, puesto que ocurriría la conversión completa de la glucosa en las capas externas, y la producción de NADPH ocurre en la superficie de la fibra.
4. Los sensores termales se basan en la retención del calor, para medir el calor generado por la reacción enzimática. Esto dará lugar a la desnaturalización a largo plazo. Los sensores amperométricos no están térmicamente aislados, de modo que la disipación de calor es más eficiente.

Capítulo 8

1. Falso. Las “figuras de merito” analíticas y biológicas no son siempre las mismas.
2. El criterio principal es la disponibilidad de conocimiento para dirigir un proceso de diseño racional. Criterios secundarios pueden ser la carencia de un método disponible para buscar (screen) en una biblioteca o almacén grande, y la naturaleza de la mejora deseada.
3. En el primer caso, la diversidad generada será baja; los productos de PCR consistirán principalmente en copias perfectas del templado, sin mutaciones. En el segundo caso, es improbable que una proteína funcional sea producida debido a la muy elevada tasa de error.
4. El número de moléculas originales de DNA en 5 ng de moléculas molde es cerca de $6,72 \times 10^9$. La masa de las moléculas molde no fue incluida en el cálculo de la masa total de DNA.

Nº de ciclos	Nº de copias de DNA (por cada molécula molde)	Moléculas copiadas	Masa de DNA en gramos
5	31	$2,08 \times 10^{11}$	$1,55 \times 10^{-7}$
15	32.767	$2,20 \times 10^{14}$	$1,64 \times 10^{-4}$
30	$1,07 \times 10^9$	$7,19 \times 10^{18}$	5,35
60	$1,15 \times 10^{18}$	$7,72 \times 10^{27}$	$5,75 \times 10^9$
500	$3,27 \times 10^{150}$	$2,20 \times 10^{160}$	$1,64 \times 10^{142}$

Capítulo 9

- 1.(a) pH 6: Ambas proteínas se cargan positivamente, y migrarán hacia el cátodo.
(b) pH 8,5: La mioglobina tiene carga negativa y migrará hacia el ánodo, mientras que el citocromo c tiene carga positiva y emigrará al cátodo.
- 2.(a) El SDS carga negativamente y en la misma relación carga / masa a las proteínas, así que las muestras se aplican en el extremo catódico del gel y migrarán hacia al ánodo.
(b) La proteína más pequeña migra más lejos, es decir la proteína X.
(c) La distancia migrada es proporcional al $\log(MW)$. Usando esta relación con los dos puntos dados, el MW de la incógnita es de 26,3 kD.

3. Las proteínas teñidas con azul de Coomassie se visualizan como bandas azules. Las bandas de DNA teñido con etidium solo se observan bajo iluminación UV.
4. Si el $\text{pH} > 3$, el DNA siempre se carga negativamente, y todas las proteínas presentarán carga positiva, de modo que el DNA y las proteínas se transferirán en diferentes direcciones.
5. El etidium teñirá todo el DNA presente, mientras que la sonda de DNA se unirá solamente a su secuencia complementaria.

Capítulo 10

1. La regresión de la distancia (cm) respecto $\log(\text{MW})$ produce la siguiente línea $y = (-1,56)x + 11,6$; a partir de ella, $y = 3,03$ cm da $\log(\text{MW}) = 5,49$; entonces $\text{MW} = 309$ kD.
2. La proteína tiene una relación de subunidades de 2 (75 kD) : 1 (50 kD), con un MW mínimo de 200 kD.
3. Una regresión de la distancia (cm) respecto $\log(\text{longitud, BP})$ produce la siguiente recta, $y = (-55,45)x + 224,3$; a partir de ella, $y = 15,27$ cm produce $\log(\text{longitud}) = 3,77$; entonces, la longitud de la incógnita es de 5884 BP.
4. (a) Cátodo = inferior; Anodo = superior; las muestras son aplicada en la parte inferior.
(b) 5'-GCGATCACCG-3'

Capítulo 11

1. La electroforesis de zona causa una migración continua en una dirección, mientras que se aplique voltaje; las bandas pueden migrar hacia la derecha del gel. IEF causa migración inicial, pero alcanza un estado estacionario cuando todas las proteínas alcanzan sus valores de pI y tienen carga neta = cero.
2. El rango de pH del gel es 6,5 (ánodo) – 7,5 (cátodo), sobre un longitud de 10 cm. Las tres variantes de HB estarán a 0,8 cm (pI 7,42), 2,9 cm (pI 7,21) y 4,5 cm (pI 7,05) desde el extremo catódico del gel.
3. Después de la finalización del experimento IEF, el gel se expone a una solución que contiene el conjugado E-Ab. La enzima se elige para que convierta un sustrato incoloro en un producto fuertemente coloreado. Una banda coloreada aparece donde el Ab se une a su Ag. La reacción de las proteínas con el SDS, necesaria en la segunda dimensión de la separación 2D, resulta en la pérdida de la estructura terciaria y cuaternaria del antígeno, de modo que probablemente el Ab ya no presente afinidad y no se una al Ag.
4. IEF se realiza con proteínas en su estado nativo, y se basa en la migración hasta alcanzar su pI en el gel. El SDS modifica la estructura de la proteína, cargándolas negativamente, con una relación carga / masa uniforme, de tal manera que la separación se basa solamente en el tamaño (tamizado).
5. Los ácidos nucleicos tienen intrínsecamente un cociente carga / masa uniformemente negativo, debido al cadena principal de azúcar-fosfato. Un experimento de IEF en el rango de pH 6-8 causarían la migración de los ácidos nucleicos hacia el extremo anódico del gel.

- El gel IPG-DALT muestra la presencia de dos subunidades. Una tiene pI de 8,2 y MW = 50 kD, mientras que la otra tiene pI de 7,1 y MW = 80 kD. Dado que la banda de 80 kD es mas oscura (mayor), la proteína intacta posiblemente contenga dos subunidades de 80 kD y una de 50 kD.
- Marcadores de MW son agregados al final del experimento de IEF, a uno de los extremos del gel IEF, de tal manera de que no interfiera el enfocando de las proteínas a analizar, y produzca una serie de bandas distintivas en un lado del gel 2D

Capítulo 12

- Utilizando la Ecuación 12.7, el tiempo de retención (a) aumenta por un factor de cuatro, (b) disminuye por un factor de 2, y (c) aumenta por un factor de dos.
- La modificación con APTES causará una deriva anódica, por ello el detector se debe colocar en el extremo anódico del tubo capilar.
- El m/z más bajo corresponde a la carga más alta (+8), y el m/z más alto corresponde a la carga más baja (+5). Los cuatro valores calculados de MW son entonces 7504, 7497, y 7500, tan MW = 7500.
- El grupo amino primario de todos los aminoácidos es reactivo. Este se puede derivatizar, por ejemplo, con un grupo aldehído presente en una especie redox activa, tal como ferrocenocarboxialdehído, $(C_5H_5)Fe(C_5H_4CHO)$.
- El detector de coincidencia elimina ruido de fondo; su funcionamiento requiere que ambos PMT registren un evento simultáneamente para considerarlo una cuenta.
- La relación G:A:C:T es 8:4:2:1. Por ello, la secuencia puede ser leída como 5'-CTGCAGCAT-CATG-3'. La secuencia complementaria (analito) es entonces 5'-CATGATGCTGCAG-3'.
- Para eluir el patrón de bandas en el extremo anódico (ácido) del tubo capilar, las proteínas enfocadas deben desarrollar carga negativa. Esto se logra cambiando las condiciones agregando una sal (como NaCl) al depósito anódico de la solución tampón.

Capítulo 13

- (a) $RCF_{\min} = 97.890 g$, $RCF_{\max} = 179.465 g$, $RCF_{av} = 138.678 g$.
(b) No; la relación entre rpm y la fuerza g no es lineal.
- (a) $k = 114$.
(b) El rotor vertical con $k = 8$.
- 48.036 rpm.
- Los valores k son 469 (40.000 rpm); 833 (30.000 rpm); 1875 (20.000 rpm) y 7500 (10.000 rpm).
- Los virus de la gripe ≈ 16 min; subunidades ribosomales, 4,5 y 3 h para las pequeñas y las grandes, respectivamente.
- 5,52 S (Svedberg)

Capítulo 14

- 1.(a) 1,6
(b) La proteína X tiene MW mayor porque eluye antes que la proteína Y.
2. Un gráfico de $(V_E - V_o)$ vs $\log(MW)$ produce una ecuación de regresión $y = (-30)x + 160$; si $y = 26,2$ mL, $x = 4,46$; lo que corresponde a un $MW = 28,8$ kD.
3. Si la mezcla contiene otras deshidrogenasas, una columna de afinidad (por ejemplo cibacron blue) separará todas las deshidrogenasas. Entonces, la cromatografía de intercambio iónico se puede utilizar para aislar la deshidrogenasa de interés basado en la carga neta y distribución de carga en la deshidrogenasa de interés.
4. Un gráfico de $1/(V_R - V_o)$ (en unidades L) contra [glutamato] (en unidades μM) da lugar a una curva de ecuación $y = 100x + 10$. La constante de asociación se calcula como la pendiente / ordenada de origen, y es $10 (\mu M^{-1})$, o $1,0 \times 10^7 M^{-1}$.

Capítulo 15

1.

Compuesto	Formula	Monoisotopica	Promedio
Glicina (Gly o G)	$C_2H_5NO_2$	75,0319	75,0677
Triptófano (Trp o W)	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	204,0896	204,2303
Polipéptido	$C_{84}H_{101}N_{15}O_{14}$	1543,7629	1544,8325
Insulina porcina	$C_{256}H_{381}N_{65}O_{76}S_6$	5773,6183	5777,6755
Mioglobina	$C_{769}H_{1212}N_{210}O_{218}S_3$	16.972,9091	16.983,7061
Proteína heterodimera grande	$C_{1802}H_{2933}N_{532}O_{462}S_{12}$	39.770,8635	39.796,4794

2. El pico monoisotopico es el más intenso en compuestos de bajo peso molecular. Cuando el número de átomos de carbono aumenta, las moléculas que llevan uno o más átomos de ^{13}C llegan a ser comunes, y por lo tanto estos picos son más intensos. Cuando el MW es elevado, hay una probabilidad insignificante de que las moléculas no tengan la menos un átomo de ^{13}C ; por lo tanto el pico monoisotopico no es observable en estos espectros.

3.

Carga del ión	Símbolo	Masa del ión	Posición (m/z)
+1	$(M+1H)^+$	23.631,36	23.631,36
+2	$(M+2H)^{+2}$	23.632,36	11.816,1800
+3	$(M+3H)^{+3}$	23.633,36	7877,7866
+4	$(M+4H)^{+4}$	23.634,36	5908,5900
+5	$(M+5H)^{+5}$	23.635,36	4727,0720
+6	$(M+6H)^{+6}$	23.636,36	3939,3933

4.

m_2	m_1	Δm	n_2 (calculada)	n_2 (unidades integrales)	M
1306,4	1219,4	87,0	14,00	14	18.275,6
1219,4	1143,3	76,1	15,01	15	18.276,0
1143,3	1076,1	67,2	16,00	16	18.276,8
1076,1	1016,3	59,8	16,98	17	18.276,7
1016,3	963	53,3	18,05	18	18.275,4

- (a) Rango del espectrómetro m/z
 (b) Concentración despreciable o muy baja.

5. Al nivel del 50% Δm es $\approx 2,9$, y $M \approx 1204,5$, entonces la resolución calculada es ≈ 415 utilizando la definición de FWHM.

ÍNDICE ALFABÉTICO

- β -Galactosidasa, 132, 148, 155, 183, 412
 Absorbancia molar, 72
 Acetato de celulosa, 217, 269
 Acetilcolina, 113, 176
 Acetilcolinesterasa, 113,
 Acido bicinónico, 18
 Acido diaminobenzoico, 23
 Acido glutámico, 263, 383
 Acidos grasos libres, 30, 37
 Acoplamiento genotipo-fenotipo, 198
 Acrilamida, 98, 219, 271, 274
 Actividad específica, 52, 53, 58, 100, 134, 140,
 148, 153
 Aerogeles, 342
 Afinidad aparente, 55
 Agente reductor. 95, 241, 409
 Alcohol deshidrogenasa, 244, 291
 Aminotiofenol, 29
 Amortiguamiento, 180
 Amperométrico, 18, 106, 168, 172, 294
 Ampholine, 266, 272
 Análisis cualitativo, 270, 361, 392, 405
 Análisis cuantitativo, 63, 392
 Anemia falciforme, 246, 267
 Anfolitos, 265, 300
 Antibióticos, 154, 190, 406
 Anticuerpos catalíticos, 174, 205
 Anticuerpos, afinidad, 122
 Anticuerpos, clases, 118
 Anticuerpos, estructura, 116
 Anticuerpos, monoclonal, 119, 120, 256
 Anticuerpos, policlonal, 119, 122, 160, 256
 Anticuerpos, precipitina, 125,
 Anticuerpos, prueba de aglutinación, 123,
 Antígeno, 115, 121, 123, 125, 131, 140, 155,
 256, 259
 Antisuero, 118, 256, 258
 Apagamiento de fluorescencia, 74, 132, 140,
 150, 152
 Apoenzima, 153, 154
 APTES, 90
 ARIS, 153, 154
Arthromyces, 77
 Aspartato aminotransferasa, 50, 81
Aspergillus niger, 37
 Avidina, 132, 164, 207, 236
 Azul de Coomassie, 128, 229, 275
 Azul de molibdeno, 27
 Bacteriófagos, 200
 Biblioteca de ADN, 193, 194, 199, 201, 203
 Bidimensional, electroforesis, 217, 274
 Bifuncional, 96, 133
 Bio-Gel, 342, 343
 Bioluminiscencia, 63, 76
 Biosensor, amperométrico, 168, 173
 Biosensor, definición, 167
 Biosensor, piezoeléctrico, 180
 Biosensor, potenciométrico, 175
 Biosensor, respuesta, 170
 Biosensor, termistor, 181
 Biotina, 205, 236, 257
 Bradford, 19, 23
 Bromuro de etidio, 229
Brucella abortus, 123
 BSA; ver seroalbúmina bovina
 Calidad de los datos, 392
 Calorimetría, 63, 81
 Capa de difusión, 100, 103, 111, 169
 CEDIA, 154, 155
 Celulosa, 89, 92, 136, 215, 269, 345, 353, 360
 Ciclo termal, 250
 Cinética enzimática, 39, 103, 108
 Cobre alcalino, 19, 27
 Coeficiente de correlación, 398
 Coeficiente de retención, 338, 340
 Coeficiente de sedimentación, 310, 322
 Coeficiente de selectividad, 354
 Coeficiente de variación, 142, 394

- Colesterol esterasa, 37, 70, 77, 177, 183
 Colina oxidasa, 113
 Comisión de enzimas, 36
 Conductimetría, 80
 Conductividad, 80, 212, 265, 270, 283, 287
 Constante de asociación, 33, 119, 159, 184, 349, 352
 Coomassie Blue, 17, 19, 128, 229, 257
 Cornish-Bowden-Eisenthal, 43, 46, 47
 Creatinina quinasa, 49, 145
 Cristal piezoeléctrico, 180
 Cromatografía de afinidad, 118, 133, 336, 344
 Cromatografía en fase normal, 344
 Cuadrados mínimos, 396
 DABA, 23
 D-aminoácido oxidasa, 33, 37, 84, 85
 Densitómetro, 230
 Desorden genético, 246
 Desviación estándar relativa, 393, 394
 Dextrano, 178, 218, 337, 342, 353
 Diagrama de Ferguson, 239, 240
 Difenilamina, 23, 24
 Difusión de Eddy, 340
 Difusión en remolino, 340, 341
 Dispersión de la luz, 78
 Distancia evolutiva, 194
 Distribución normal, 395
 Distribución t, 396
 Doble-difusión, método, 126
 Dosis efectiva, 401
E. coli, 191, 193, 201, 208, 235, 274, 276, 324, 325, 381, 384, 387, 407
 Eadie-Hofstee, 43, 47
 Efecto de filtro interno, 74
 Efecto de pared, 308, 320
 Electrocinética, 285, 288, 299
 Electroendósmosis/Electroósmosis, 218, 273, 281, 283, 298
 Electro spray, 290
 Electroferograma, 273, 289, 292
 Electroforesis capilar de zona, 282, 286, 287
 Electroforesis capilar, descripción matemática, 282
 Electroforesis capilar, detectores, 287
 Electroforesis cohete, 258
 Electroforesis de estado estacionario, 215, 281
 Electroforesis de zona, 214, 221, 240, 267
 Electroforesis en disco, 221
 ELISA, 145, 156, 256
 Endonucleasas, 195, 245, 246, 248, 386
 Energía libre, 39, 354, 355
 Enzima (s), activadores, 37, 52, 106, 404
 Enzima (s), actividad específica, 52, 53, 58, 100, 134, 140, 148, 153
 Enzima (s), afinidad aparente, 55
 Enzima (s), cinética, 39, 67, 68, 103, 108, 170, 184
 Enzima (s), complejo, 39, 40, 53, 58
 Enzima (s), nomenclatura, 35
 Enzima (s), pH óptimo, 51, 100, 101, 147
 Enzimas de restricción, 195, 245, 248
 Enzimas inmovilizadas, 87, 182
 Epitope, 118, 120, 125, 131, 137, 150, 158, 194, 256, 350
 Error al azar, 393
 Error estándar de la media, 395
 Error sistemático, 393
 Estabilidad operacional, 184,
 Estándares de peso molecular, 222, 240, 338
 Estreptavidina, 132, 205, 236, 258,
 Exclusión estérica, 105, 337, 339
 Fab, 117, 349
 Factor de capacidad, 332
 Familias de iones, 374
 Ferricianuro, 27, 31, 79, 173,
 Ferroceno, 79, 132, 172, 173
 Ferrocianuro, 28
 Ficina, 110
 Ficoll, 312
 Filtración en gel, 336, 338, 343
 Filtro de masa, 370
 FITC, 75, 177, 179, 288
 Flotación secuencial, 328
 Fluorescamina, 22
 Fluorescencia inducida por láser, 288, 299
 Folin-Ciocalteu, 17
 Forense, 248, 250
 Fosfatasa alcalina, 72, 132, 147, 231, 236
 Fuerza centrífuga relativa, 306
 Furfural, 26, 27, 29
 Fusarium sp., 207
 Galactosa oxidasa, 193, 207,
 Gel de almidón, 218, 231
 Gel de poliacrilamida, 98, 219, 226, 242, 251, 270, 282, 298, 342, 386
 Gel de poliacrilamida, tamaño del poro, 222

- Gel de agarosa, 89, 104, 215, 218, 223, 225, 232, 243, 245, 249, 258, 275, 342, 345, 353
 Generador de gradiente, 313, 327
 Glucosa oxidasa, 37, 51, 67, 71, 111, 132, 149, 167, 172, 182,
 Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 67, 132, 148, 153, 183, 231
 Glutaraldehído, 96
 Gradientes autogenerados, 313
 Gradiente de densidad, 309, 311, 313, 318
 Gradiente de pH, 265, 270, 273, 354
 Grado de confianza, 395
 Grupo prostético, 33, 36, 50, 52, 132, 154, 191
 Grupos sanguíneos, 123, 125
 Hanes, 44
 Hemoglobina, 231, 246, 267, 272
 Heterología, 158
 Hexametilendiacrilamida, 99
 Hibridoma, 120
 Híbridos, 204,
 Hipoxantina, 79, 120
 Hoechst, 25
 Homocisteína, 108, 410
 Homogenato, 20, 315
 Huella digital, 379, 386
 Inhibición incompetitiva, 56
 Inhibición competitiva, 54
 Inhibición irreversible, 53
 Inhibición no-competitiva, 55
 Inmunoblotting, 256
 Inmunodifusión radial, 127, 258
 Inmunolectroforésis, 229, 256, 258
 Inmunoensayo competitivo, 154, 158
 Inmunogenico, 115, 119, 158, 160, 174
 Inmunoglobulinas, 117, 149, 256, 345, 349
 Intercalantes, 25
 Intercambiadores iónicos, 339, 353, 356, 358
 Inyección electrocinética, 285, 288, 299
 Inyección hidrodinámica, 285, 299
 Iones moleculares, 290, 363, 365, 372, 377
 Ionización, 290, 292, 300, 361, 363, 374, 377, 385, 387
 Isoenzimas, 35, 218, 239, 244, 267, 348
 Isopícnico, 309, 318
 Isotiocianato de fluoresceína; ver FITC
 Katal, 58
 Lacasa neutral (ver β -Galactosidasa)
 Lactato deshidrogenasa, 35, 37, 51, 68, 348
 Látex, 132, 149
 Ley de Beer-Lambert, 71
 Límite móvil, 214, 263, 321
 Límites de confianza 395, 397
 Lineweaver-Burk, 44, 47, 54
 Lipoproteínas, 319, 328
 Logit, 139, 157, 340, 400
 Lowry, 17, 20
 Luciferasa, 77, 203
 Luminol, 76, 132, 143
 MAGIChip, 386
 MALDI, 364, 366, 370, 381, 384, 387
 Manometría, 81
 Marcador de frente, 239
 Masa monoisotópica, 373, 381
 Masa nominal, 373
 Masa promedio, 373
 Material de referencia, 402
 Maxam-Gilbert, 251
 Mediador, 79, 170, 173, 174
 Mercaptoetanol, 95, 223, 241, 275
 Métodos manométricos, 81
 Mezcla de familia, 197
 Michaelis-Menten, 42, 43, 53, 103, 109, 170
 Microplacas, 19, 20, 82, 136, 143, 147, 162, 169, 204
 Milstein, 119
 Modo de ión negativo, 385
 Monosacáridos, 28, 29
 Movilidad electroforética, 213, 218
 MS/MS, 370, 379, 381
 Mucopolisacáridos, 229
 Nefelometría, 63, 78
 Nelson, 27
 Nernst, 103
 Nick, 235
 Ninhidrina, 20, 23, 65
 Nitración, 21, 23
 Nitrocelulosa, 143, 232, 233, 235, 245
 Nomograma, 16
 Northern blot, 233
 Nylon, 89, 99, 105, 232, 235, 245
 Orcinol, 26
 PAGE, 219, 223, 239, 242, 245, 251, 256, 274, 298
 Parámetros de la regresión, 397, 399
 Paratope, 118, 121, 131, 150, 160

- Paternidad, 249
 PCR, 190, 250, 386
 Percoll, 312
 Peroxidasa, 37, 66, 70, 72, 76, 132, 143, 147, 149, 160, 231, 236, 257
 Persulfato, 98, 219, 274
 pH óptimo, 51, 100, 102, 147
 pH-Stat, 79
 Picos isotópicos, 372, 377
 Piezoelectrico, 180
 Placas multipozo, 19, 20, 82, 136, 143, 147, 162, 169, 204
 Plásmido, 199, 201, 208, 312
 Plata, 229, 231, 258
 Platos teóricos, 283, 333, 341
 Polarización, 132, 151, 408, 411
 Polietilenglicol, 115, 136, 346
 Polimerasa, 195, 208, 235, 250, 298, 345
 Polimorfismo, 248, 363, 386
 Poliornitina, 101
 Polisacáridos, 27, 29, 91, 208, 319, 342
 Potenciometría, 79
 Precipitina, 125, 258
 Proteasa, 41, 74, 82, 190, 345, 381
 Proteína (s), diseño racional, 191, 193
 Proteína (s), ingeniería, 191
 Prozona, 123
 Prueba de aglutinación, 123
 Punto isoelectrico, 207, 215, 218, 225, 274
 Puromicina, 203
 Quimioluminiscente, 132, 143, 144
 Quimiotaxonomía, 387
 Radioinmunoanálisis, 138, 140, 145
 Radioisótopos, 132, 140, 145
 Radioquímica, 287, 297
 Rango dinámico, 25, 145, 175, 183, 398
 RCF, 306
 Reacción acoplada, 65, 68
 Reacción de la precipitina, 125, 127
 Reacciones de marcado, 133
 Reactividad cruzada, 119, 157, 160, 402, 405, 411, 414
 Rodamina, 140, 153, 179
 Rotor, ángulo fijo, 308, 314, 327
 Rotor, oscilantes, 308
 Rotor, vertical, 310, 314, 327
 Scatchard, 122
 SDS, 23, 29, 223, 242, 275, 342
 SDS-PAGE, 222, 243, 256, 274, 276, 319
 Sector magnético, 292, 362, 366, 368, 370
 Secuenciación, 227, 229, 238, 251, 253, 255, 282, 297, 299, 380, 386
 Sephacryl, 342, 343
 Sephadex, 89, 92, 337, 339, 342, 343
 Sepharose, 89, 342, 342, 345, 348, 352
 Serina acetiltransferasa, 325
 Seroalbumina bovina, 17, 21, 27, 29, 31, 322, 358, 376
 Silanización, 90
 Silanol, 90, 300, 302
 Smith (BCA), 18, 20, 23
 Sodio dodecilsulfato; ver SDS
 SOMA, 386
 Southern blot, 232, 236, 249
 SRID, 127
 Student, 396, 394
 Subunidades, 106, 119, 154, 223, 238, 241, 244, 259, 267, 307, 324
 Sulfato de amonio, 23, 83, 98, 118, 135
 Sustrato sintético, 72, 75, 148
 Svedberg, 311, 319, 322, 324
 Talasemia, 272
 Teoría electroforética, 211
 Termistor, 181
Thermus aquaticus, 195, 250
 Tiempo de vuelo, 370
 TOF-reflectrón, 370, 381
 Trampa de iones, 371
 Transformada de Fourier, 371, 381
 Triazina, 91, 95, 161
 Tubo de vuelo, 370
 Ultracentrifugación, 318, 320, 325
 Umbeliferona, 132, 140, 141, 154
 Unidades internacionales, 57
 Urea, 39, 80, 82, 105, 108, 132, 148
 Valores de corte, 414
 van Deemter, 334
 Velocidad de rotación, 306
 Velocidad de sedimentación, 305, 317, 322
 Western blot, 233, 256
 Wheatstone, 182
 Zona de aglutinación, 123



COLECCIÓN MANUALES

La química bioanalítica es un área fundamental de la química, especialmente en el ámbito de los trabajos en biotecnología, bioingeniería, farmacia y química clínica así como en el de las investigaciones biológicas y bioquímicas. Tiene métodos propios que no son tratados de manera suficiente en la bibliografía clásica.

Este libro se propone llenar ese vacío y, de ese modo, se convierte en un instrumento fundamental para estudiantes de todas las áreas afines. Contiene una clara y concisa introducción a los métodos bioanalíticos más usados y sus principios y variantes; además describe los protocolos esenciales para el trabajo con muestras reales, a través de lo cual hace posible el conocimiento y comprensión de los principios físicos y químicos sobre los que se basa cada procedimiento que el estudiante aplicará después en el trabajo de laboratorio. También incluye la explicación de técnicas aplicadas por bioquímicos y biólogos moleculares teniendo en cuenta sus aspectos prácticos y desarrollando el tratamiento matemático sólo en la cantidad necesaria para asegurar la claridad de los temas expuestos.

Asimismo, la utilidad de este texto excede el ámbito universitario y alcanza a los profesionales de laboratorios de análisis clínicos, industrias biotecnológicas, industrias farmacéuticas y laboratorios dedicados a investigaciones básicas o aplicadas.

 **eudeba**
www.eudeba.com.ar

