



Facultad de Química-Farmacia
Departamento de Licenciatura en Química

TRABAJO DE DIPLOMA

**“Análisis estequiométrico de la
reacción de conjugación del péptido
P0 a la proteína BM86 empleando el
conector MPS”**

Autor: Lianny Pérez Gómez

Tutores: Dr. Nemecio González Fernández

MsC. Carlos Perez Heredia

MsC. Jeanette Escobar Vázquez

2016

“Año 58 de la Revolución”

«El científico no tiene por objeto un resultado inmediato. El no espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para aquellos que están por venir y señalar el camino».

Nikola Tesla

Dedicatoria:

- ✚ *A quien me dio tanto cariño, tanto amor y fue siempre tan paciente conmigo, a quien perdió la cuenta de cuantos viajes realizó, primero al IPVCE y luego hasta la UCLV, con tal de que yo estuviera segura y que todo me saliera bien en los estudios: Mi Papá.*
- ✚ *A quien siempre me cuidó exageradamente (como a una niña pequeña), me dio su apoyo, me brindó fuerza y optimismo: Mi mamá.*
- ✚ *A quien siempre me dio su hombro para llorar y me dio palabras de aliento cuando más difícil se me hacían los días en la universidad, a quien me brindó mucho amor y que con su buen humor me hizo muy felices estos 5 años: Mi novio Ivan.*
- ✚ *A la memoria de quien siempre me estuvo protegiendo y señalando el camino a seguir para que no me lastimara: Mi abuelito Vitico.*

Agradecimientos

- ✚ *A mis tutores camagüeyanos Dr. Nemecio González Fernández y MsC. Carlos Perez Heredia que siempre me dieron palabras de aliento y optimismo y que con su buen humor hicieron mucho más agradables estos momentos de tanta tensión.*
- ✚ *A mi tutora MsC. Jeanette Escobar Vázquez por brindarme su apoyo y su ayuda incondicional en los momentos que más la necesitaba.*
- ✚ *A mi oponente Alina por darme tanto apoyo y comprensión incondicional, solo lamento no haberla conocido antes, porque me demostró ser una profesora excepcional.*
- ✚ *A mi profesor Elio Soto por su constante ayuda y solidaridad en todo momento.*
- ✚ *A mi profesor José Orestes por darme un espacio de su tiempo cuando más lo necesitaba.*
- ✚ *A mi profesor Evis por brindarme su ayuda incondicional.*
- ✚ *A mi profesora Carolina por ayudarme cuando tanta falta me hacía.*
- ✚ *A mi profesor Eugenio por brindarme su apoyo y sus conocimientos de manera incondicional.*
- ✚ *A mi profesor Oscar por ser tan paciente y brindarme ayuda en un momento tan difícil.*
- ✚ *A todos mis profesores durante los cinco años de carrera, aunque parezca mentira, les agradezco que nos hayan hecho el camino tan difícil, porque eso me hizo crecerme como profesional y darme cuenta que los triunfos que más se disfrutan son aquellos a los que más costó alcanzar. Gracias por todo lo que me enseñaron, sé que me va a hacer mucha falta y que me voy a sentir súper orgullosa el día de mañana cuando pueda decir, eso me lo enseñaron mis profesores de la UCLV.*
- ✚ *A todos mis compañeros de aula, especialmente a Luisi, Raúl y a Leidy por brindarme la mejor etapa de mi vida estudiantil y hacerme estos años lejos de mi familia mucho más agradables y felices.*
- ✚ *A la familia de mi novio que también es mi familia, por acogerme en su casa todo este tiempo y hacerme sentir tan feliz y tan bien recibida.*
- ✚ *A mi abuelita Silvia por siempre rezar por mí y trasmitirme todo su optimismo.*
- ✚ *A toda mi familia por darme tanto apoyo, tanta fuerza y tanto amor durante todo este tiempo.*
- ✚ *A la virgen de La Caridad del Cobre por siempre escuchar mis súplicas, por señalarme el camino y estar conmigo en los momentos más difíciles.*

A todos Muchas Gracias

Resumen

Una de las nuevas estrategias en el campo de la medicina constituyen los preparados vacunales basados en péptidos sintéticos. Actualmente en el CIGB de Camagüey se está trabajando en la elaboración de un vacuna contra enfermedades hemoparasitarias en perros cuyo principio activo es el péptido sintético P0. Para aumentar su inmunogenicidad y evitar que se degrade en el organismo del mamífero, el péptido P0 se conjuga a la proteína BM86 empleando el conector cruzado heterobifuncional MPS. El objetivo de este trabajo fue determinar la relación molar en que deben ser mezclados la proteína BM86, el péptido P0 y el reactivo MPS durante la reacción de conjugación, de manera que no se genere un exceso de ninguno de estos reactivos y tratando de conjugar la mayor cantidad de péptido posible para lograr aumentar su inmunogenicidad. A esta reacción de conjugación se le dio seguimiento mediante el ensayo de Ellman para la determinación de grupos sulfhidrilos libres. Se obtuvo que como promedio por cada mol de proteína BM86 se logran conjugar 47 moles de MPS y 45 moles de P0. Paralelamente se demostró que el método de Ellman es una herramienta factible para el seguimiento de la reacción de conjugación y se determinó que disminuyendo la concentración de oxígeno disuelto en el medio de reacción se logra la mayor estabilidad del péptido P0 a la dimerización.

Abstract

Synthetic peptides are one of the new strategies in the field of medicine to vaccine formulation. Currently in the CIGB in Camagüey it is working on developing a vaccine against blood parasitic diseases in dogs. The active ingredient of this vaccine is the synthetic peptide P0. To increase its immunogenicity and avoid degradation in the mammalian body, the P0 peptide is conjugated to the protein BM86 using heterobifunctional cross linker MPS. The aim of this study was to determine the molar ratio to be mixed the BM86 protein, P0 peptide and the MPS reagent during the conjugation reaction, so that an excess of any of these reagents is not generated and trying to combine peptide as much as possible to achieve increase its immunogenicity. The conjugation reaction was followed by Ellman's test for free sulfhydryl determination groups. Was obtained that 47 moles of MPS were conjugated as an average per mole of protein BM86 and 45 moles of peptide P0. Ellman's method was useful as a tool to follow the conjugation reaction. Lowering the dissolved oxygen concentration in the reaction media can achieve higher P0 peptide stability to dimerization.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1. Marco Teórico	4
1.1 Enfermedades hemoparasitarias	4
1.1.2 <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	5
1.2 Vacunas peptídicas para contrarrestar enfermedades hemoparasitarias.....	7
1.2.1 El Péptido P0 como principio activo de una vacuna contra enfermedades hemoparasitarias en perros.....	8
1.3 Conjugación de péptidos a proteínas portadoras.....	9
1.3.1 Grupos funcionales reactivos en proteínas portadoras	10
1.3.1.1 Proteína portadora BM86.....	11
1.3.2 Reactivos de reticulación o conjugación	12
1.3.2.1 Elección del agente de reticulación.....	13
1.3.2.2 Aplicaciones de los agentes de reticulación.....	14
1.3.2.3 Agentes reticulantes homobifuncionales.....	16
1.3.2.4 Agentes reticulantes heterobifuncionales.....	19
1.3.2.5 MPS como conector cruzado heterofuncional.....	21
1.3.2.5.1 Éster de NHS.....	22
1.3.2.5.2 Maleimido	24
1.3.3 Mecanismo de conjugación de la proteína BM86 al péptido P0 empleando MPS.....	25
1.4 Condiciones generales de reacción	26
1.5 Ensayo de Ellman.....	26
Capítulo 2: Materiales y Métodos	30
2.1 Procedimiento experimental.....	30
2.1.1 Obtención de la curva de calibración empleando el método de Ellman.....	30
2.1.2 Cuantificación del número de moléculas de MPS activas.....	31
2.1.3 Cuantificación del péptido P0 en forma de monómero	32
2.1.4 Evaluación de la formación de puentes disulfuros en el péptido P0.....	32
2.1.5 Conjugación del Péptido P0 a la proteína BM86 (primera etapa).....	32
2.1.5.1 Reacción del MPS con la proteína BM86	33
2.1.5.2 Cuantificación del MPS que reacciona con la proteína BM86.....	33
2.1.5.3 Separación del MPS en exceso para realizar la segunda etapa de conjugación	34

2.1.5.4 Comprobación mediante HPLC por exclusión molecular de la separación del MPS en exceso	35
2.1.6 Conjugación del Péptido P0 a la proteína BM86 (segunda etapa)	35
2.1.7 Análisis estadístico y procesamiento de datos.....	36
Capítulo 3: Resultados y Discusión	37
3.1 Curva de calibración para el ensayo de Ellman	37
3.2 Cuantificación de las moléculas de MPS activas	39
3.3 Cuantificación de P0 en forma de monómero	40
3.4 Evaluación de la formación de puentes disulfuros en el péptido P0 en el tiempo	42
3.5 Conjugación del péptido P0 a la proteína BM86 (primera etapa)	46
3.5.1 Determinación de los moles de MPS que reaccionan por cada mol de BM86.....	46
3.5.2 Comprobación mediante HPLC por exclusión molecular de la separación del MPS en exceso.....	49
3.6 Conjugación del péptido P0 a la proteína BM86 (segunda etapa)	51
3.7 Establecimiento de la relación molar BM86-MPS-P0	54
Conclusiones	57
Recomendaciones.....	58
Revisión Bibliográfica	59
Anexos.....	¡Error! Marcador no definido.

Introducción

El presente trabajo se realiza en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey (CIGB), primer centro científico de su tipo creado fuera de la capital cubana. Uno de los propósitos fundamentales de este centro es favorecer a través de la ciencia el desarrollo económico de Cuba. Con esta meta durante las dos últimas décadas, su colectivo de trabajadores, ha desarrollado varias líneas de investigación relacionadas fundamentalmente con la agrobiotecnología. En este sentido, se trabaja en la elaboración de productos que contribuyen a controlar las principales enfermedades y plagas que atacan a plantas y animales. Entre los principales productos se encuentra el HeberNem, utilizado para el control de nemátodos, parásitos que afectan las raíces de los cultivos y la vacuna Gavac efectiva en la disminución de las enfermedades hemoparasitarias asociadas a la garrapata en el ganado vacuno.

Actualmente se trabaja en el área de desarrollo tecnológico en un proyecto enfocado hacia la elaboración de una vacuna garrapaticida en perros. Esta vacuna posee como principio activo el péptido P0.

El péptido P0 está formado por los últimos 20 aminoácidos de la proteína P0, la cual constituye un componente estructural de los ribosomas de todos los organismos y es necesaria para la ingestión de sangre y la viabilidad de las garrapatas y, posiblemente, de otros ectoparásitos (Gonzalez, 2012). Todo ello posibilita que las composiciones vacunales basadas en el péptido P0 sean efectivas para el control de las infestaciones por ectoparásitos, como las garrapatas y sean útiles también para el control de la transmisión de los patógenos asociados a dichos ectoparásitos.

El péptido P0 es necesario fusionarlo a una proteína o péptido portador, o a un inmunopotenciador para poder incluirlo en una formulación vacunal (Gonzalez, 2012). En este caso este péptido se conjuga a la proteína BM86 con el propósito de aumentar su inmunogenicidad además de evitar que por su pequeño tamaño se degrade en el organismo del mamífero. Para la conjugación del péptido P0 a esta proteína se utiliza el éster maleimidopropionico de la N-hidroxisuccinimida (MPS), conector cruzado

Introducción

heterobifuncional. De forma general el proceso de conjugación utilizando conectores heterobifuncionales consiste en unir en una primera etapa en condiciones controladas la proteína soporte al conector y en una segunda etapa el compuesto resultante se une al péptido inmunogénico bajo determinadas condiciones (Pérez, 2007).

Para realizar esta reacción de conjugación es necesario que el péptido P0 posea un grupo sulfhidrilo reactivo al conector MPS. Por ello se requiere realizar la síntesis química de este péptido con una cisteína en el extremo N-terminal. El péptido P0 al ser un péptido sintético implica una mayor dificultad para su producción en grandes cantidades, y por ello es necesario ahorrar este péptido evitando que durante los procesos de conjugación se generen excesos del mismo. El conector MPS al ser un conector heterobifuncional y permitir por tanto conjugar dos compuestos diferentes, presenta una relevante importancia en la obtención de candidatos vacunales conjugados, lo que propicia que su precio en el mercado sea muy elevado.

Todos los inconvenientes planteados traen consigo la necesidad de analizar en qué relación molar deben ser mezclados la proteína BM86, el péptido P0 y el reactivo MPS durante la reacción de conjugación, de manera que no se genere un exceso de ninguno de estos reactivos y tratando de conjugar la mayor cantidad de péptido posible para lograr aumentar su inmunogenicidad. A esta reacción de conjugación se le pudiera dar seguimiento utilizando la determinación de grupos sulfhidrilos libres. Con este propósito se puede hacer reaccionar el exceso de conector MPS generado durante la reacción de conjugación con β -mercaptoetanol en exceso de modo que permanezcan grupos sulfhidrilos libres, mientras que el péptido P0 puede ser seguido fácilmente debido a que también posee grupos sulfhidrilos libres. Uno de los ensayos más difundido que se emplea con este fin es el ensayo de Ellman, el cual se fundamenta en la propiedad del reactivo Ellman (ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico) de oxidar los SH libres, interaccionando con el grupo tiol para dar ácido tionitrobenzoico en una reacción equimolar para cada residuo de cisteína (Wood et al., 2014).

Por todo lo anteriormente expuesto se planteó el siguiente problema científico:

¿Qué relación molar existe entre la proteína BM86, el péptido P0 y el conector MPS durante la reacción de conjugación en la obtención del principio activo?

❖ Objetivo General

Determinar la relación molar que existe entre la proteína BM86, el péptido P0 y el conector MPS durante la reacción de conjugación mediante el método de Ellman.

❖ Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad del método de Ellman para la cuantificación de grupos –SH libres.
- Determinar la estequiometría de la reacción de conjugación de la proteína BM86 con el conector MPS.
- Realizar la conjugación de la proteína BM86 al péptido P0 y por exceso del péptido determinar la estequiometría de la reacción.

Capítulo 1. Marco Teórico

1.1 Enfermedades hemoparasitarias

Las garrapatas son consideradas a nivel mundial después de los mosquitos, como los segundos vectores transmisores de patógenos responsables de más de 100.000 casos de enfermedades en humanos en todo el mundo; pero son los vectores más importantes de transmisión de agentes patógenos que causan enfermedades en animales domésticos. Las enfermedades transmitidas por garrapatas son actualmente más frecuentes que en pasadas décadas debido, entre otras razones, al cambio climático y a que continuamente se descubren nuevas especies de patógenos transmitidos por garrapatas (Rubio et al., 2015).

Las garrapatas son organismos parásitos incluidos en varias especies pertenecientes al orden *Acari* y a la subclase *Arachnida*; parasitan toda clase de vertebrados con excepción de los peces. Las garrapatas se clasifican en dos familias, la familia *Ixodidae*, también conocidas como garrapatas duras, ya que se caracterizan por tener un escudo, pequeño en las hembras y grande en los machos. Por otro lado, tenemos a las garrapatas de la familia *Agasidae* conocidas como garrapatas blandas, ya que no cuentan con escudo (Román et al., 2012).

El ciclo de vida de las garrapatas pueden cumplirlo en un solo huésped, o tres dependiendo de la familia a la que pertenezcan. En la ganadería ocasionan grandes pérdidas económicas, ya que dañan la piel de los animales infestados, disminuye la calidad de la leche y afecta la salud de los animales. También se les encuentra parasitando otras especies de ganado como es el equino, ovino, caprino y porcino. Especies domésticas como perros, gatos, aves e incluso el hombre, se ven afectados de manera importante también, ya que además del daño directo, las garrapatas son portadoras de gran cantidad de bacterias, virus y protozoarios que causan enfermedades (Manzano et al., 2013).

Los mecanismos de acción patógena, ejercidos por las garrapatas sobre el hospedador, son amplios y de varios tipos, entre ellos, el mecánico: producido por la acción de las piezas bucales de la garrapata sobre la piel del hospedador; el tóxico: debido a los componentes

enzimáticos de la saliva de la garrapata y determinadas neurotóxicas, al ser inoculadas producen parálisis flácida al dañar los receptores y las terminaciones de los nervios motores, el expoliativo pueden causar anemia y debilitamiento e inoculativo: son vectores de patógenos como Protozoarios, Bacterias y Virus (Lorenzana, 2005).

Todas las garrapatas responden exclusivamente a una combinación adecuada de temperatura, humedad, horas e intensidad de la luz. Cuando esta combinación aparece, las garrapatas están activas (en busca de hospedador) y el ciclo se desarrolla más rápidamente y con menor mortalidad. En ausencia de la combinación específica para cada especie, las garrapatas no están activas o la mortalidad es mayor. Las bajas temperaturas impiden el desarrollo del ciclo y la actividad de la mayoría de las especies. Otro factor fundamental para el desarrollo de las garrapatas es la humedad relativa, cuando ésta es elevada, siempre se favorece la supervivencia de las garrapatas y les permite permanecer mayor tiempo en actividad (Lorenzana, 2005).

1.1.2 *Rhipicephalus sanguineus*

La *Rhipicephalus sanguineus* o garrapatas caninas marrón, es la garrapata que por su distribución mundial con mayor frecuencia afecta a los perros (Izquierdo, 2012). Esta especie de garrapata se encuentra dentro de las más abundantes en Cuba por presentar un clima cálido y una elevada humedad relativa. La *Rhipicephalus sanguineus* es un artrópodo ectoparásito hematófago de la familia *Ixodidae*, que ataca preferentemente a los perros. La *Rhipicephalus sanguineus* ha sido reportada también en una amplia variedad de mamíferos de tamaño medio y grandes, así como en aves terrestres. Algunos de estos huéspedes incluyen al gato, venado, ganado bovino, liebre, cabra, caballo, borrego, león, aves avestruz, pavos, garza), reptiles y el hombre. Sin embargo el perro sigue siendo el huésped preferido cuando está presente. Es una especie cosmopolita, pero es más común en climas cálidos, dado que es sensible al frío (Rojas, 2010).

El desarrollo de la garrapata canina marrón ocurre en tres hospedadores, la larva se alimenta en un primer hospedador, cae al suelo y muda al estado de ninfa, esta se alimenta hasta estar repleta, se deja caer al suelo y muda; finalmente el adulto se sube a un tercer hospedador en donde se alimenta nuevamente y en el caso de las hembras, estas caen al

Capítulo 1: Marco teórico

suelo para poder realizar la ovoposición una vez repletas de sangre y de haber realizado la cópula. Cada fase del ciclo, se desprende del hospedador tras un periodo de tiempo variable (3 – 10 días) tras el cual muda entre la vegetación o en el interior de la perrera o construcción del hombre (Lorenzana, 2005).

La garrapata *R. sanguineus*, es uno de los vectores más importantes de enfermedades en perros y zoonosis (son enfermedades de los animales que bajo determinadas condiciones pueden afectar a los humanos) en el mundo (Izquierdo, 2012). La garrapata *R. sanguineus* es vector de agentes patógenos, como *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii* ; *Babesia vogeli* *Hepatozoon canis* y *Rickettsia rickettsii* a través de los cuales pueden causar enfermedades con manifestaciones clínicas, desde anemia, abscesos de piel (Gray et al., 2013), así como parálisis (Rubio et al., 2015). Algunas de estas enfermedades más comunes en perros son la Erliquiosis canina (fiebre hemorrágica cánica) y la babesiosis canina. Los síntomas de la erliquiosis canina incluyen cojera, fiebre, diarrea, depresión, anorexia, pérdida de peso, anemia y trastornos del sistema nervioso central entre otras. Por otra parte la babesiosis canina ocasiona fiebre, anorexia y anemia y pancreatitis aguda en los perros (Izquierdo, 2012).

La *Rhipicephalus sanguineus* se considera una especie intradomiciliaria, por lo que con frecuencia infesta al humano (Braz et al., 2011). El creciente número de casos de parasitismo humano por garrapatas *R.sanguineus* indican que la interacción entre el humano y esta garrapata puede ser más común de lo que se reconoce en realidad (Dantas-Torres and 2008), aunado al hecho de que las garrapatas *R. sanguineus* expuestas a altas temperaturas se unen y se alimentan de los seres humanos con mayor rapidez (Parola and Raoult, 2001) ; hace suponer que el riesgo de parasitismo humano por garrapatas podría aumentar en las zonas con veranos cálidos, lo cual aumenta el riesgo de transmisión de agentes zoonóticos (Rubio et al., 2015). Algunas de las enfermedades que pueden ser transmitidas por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* al humano como hospedero accidental, se encuentran la rickettsiosis, la ehrliquiosis, la babesiosis y la hepatozoonosis (Vega and Luévano, 2011). Dentro de estas enfermedades una de las más frecuentes es la rickettsiosis enfermedad que provoca escalofríos, fiebre alta, dolores articulares y

musculares, dolor de cabeza y fotofobia e incluso puede llegar a complicarse causando insuficiencia renal, meningoencefalitis, y fallo multiorgánico (Izquierdo, 2012).

El uso de plaguicidas químicos constituye la medida principal para el control de estos ectoparásitos. Sin embargo, el uso intensivo de plaguicidas químicos tiene inconvenientes como la contaminación de los alimentos, la contaminación ambiental y el desarrollo de resistencia por ectoparásitos. La vacunación es considerada por tanto como una prometedora alternativa para controlar infestaciones por ectoparásitos (Manzano et al., 2013).

1.2 Vacunas peptídicas para contrarrestar enfermedades hemoparasitarias

La vacunación se considera una alternativa promisoriosa para el control de las infestaciones por ectoparásitos desde el punto de vista de su eficacia, seguridad ambiental y sostenibilidad económica (Gonzalez, 2012). No obstante, los avances científicos en esta esfera, existen algunas dificultades en el modo actual de vacunación, que en muchos casos interfieren en el desarrollo exitoso de estas. Los problemas más comunes que se presentan se agrupan en, dificultades del proceso tecnológico de obtención de la vacuna y deficiencias por causa de las particularidades del agente infeccioso contra el que se pretende proteger (Tam J. P., 2012).

Una de las nuevas estrategias son los preparados vacunales basados en péptidos sintéticos (Tam J. P., 2012). Este enfoque tiene numerosas ventajas, entre ellas: su elevada seguridad, su fácil almacenamiento y manipulación. Además, este tipo de vacuna puede diseñarse para actuar sobre un blanco específico, apoyándose en la capacidad de los péptidos sintéticos de comportarse como antígenos para generar respuesta inmunológica. Esta se induciría contra un sitio antigénico, que en una vacuna convencional, pudiera no estar accesible al sistema inmune (S.A, 2010).

Muchas de las vacunas basadas en antígenos dirigidas contra las garrapatas tienen como objetivo neutralizar a, entre otras, las moléculas anti-hemostáticas de la saliva de las garrapatas e impedir que éstas puedan alimentarse en los hospedadores vacunados (Manzano et al., 2013).

1.2.1 El Péptido P0 como principio activo de una vacuna contra enfermedades hemoparasitarias en perros

Los ribosomas eucarióticos están conformados por moléculas individuales de ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) y más de 80 proteínas organizadas dentro de las subunidades mayor y menor. La mayoría de las proteínas ribosomales son básicas (punto isoeléctrico (pH)>8,5), pero existe además un grupo de proteínas ácidas (pH=3,0-5,0) que forman una estructura similar a un tallo en la subunidad mayor del ribosoma. Estas proteínas ácidas se denominan proteínas P (P0, P1 y P2), debido a su capacidad de ser fosforiladas, lo cual desempeña un rol fundamental en la regulación de la actividad traduccional de los ribosomas (Wojda, 2002). Las proteínas P contienen una región C-terminal conservada, de aproximadamente 17 aminoácidos, cuyos últimos seis residuos se encuentran altamente conservados, lo cual constituye la base de la reactividad inmunológica cruzada entre ellas y con las proteínas P de otras especies. La proteína P0 es fundamental para el ensamblaje de la subunidad ribosomal 60S, donde se une directamente a P1, P2, al ARNr 28S y al factor eEF2. Su ausencia conduce a la generación de ribosomas deficientes de la subunidad 60S, los cuales son inactivos para la síntesis de proteínas, conllevando a la muerte celular.

Las proteínas P son altamente inmunogénicas, y se han estudiado extensamente en humanos, debido a su asociación con enfermedades autoinmunes y con la carcinogénesis (Gonzalez, 2012).

La proteína ribosomal P0, en particular, constituye un candidato vacunal prometedor contra varios protozoos y bacterias (Zhang, 2007). Experimentos realizados han demostrado que la proteína ribosomal P0 es necesaria para la ingestión de sangre y la viabilidad de las garrapatas y, posiblemente, de otros ectoparásitos. La respuesta inmune obtenida en la mayoría de estos experimentos se caracterizó por la generación de altos títulos de anticuerpos específicos, capaces de conferir protección de manera activa y pasiva contra la infección, y la activación de linfocitos T (Gonzalez, 2012).

Sin embargo la presencia de la proteína P0 en todos los organismos, como un componente estructural de los ribosomas que es fundamental para la viabilidad celular, constituye una ventaja para el uso de estas secuencias con el objetivo de obtener candidatos vacunales contra diferentes especies de ectoparásitos (GONG, 2008). Sin embargo, el uso de esta proteína, como inmunógeno para el control de las infestaciones por garrapatas se encuentra limitado por el alto grado de identidad aminoacídica existente para este antígeno entre los ectoparásitos y sus organismos hospederos, lo que puede traer como consecuencia la inducción de tolerancia o la generación de una respuesta de autoanticuerpos en el organismo hospedante. Por tal razón solamente se trabaja con la región correspondiente a los últimos 20 aminoácidos que es la de menor identidad de secuencia entre la proteína ribosomal de las garrapatas del género *Rhipicephalus sanguineus* y sus mamíferos hospederos (Gonzalez, 2012).

Este péptido P0 se obtuvo por síntesis química con una cisteína en su extremo amino terminal utilizando el servicio de síntesis de péptidos del CIGB.(Mallon, 2013). La secuencia aminoacídica del péptido P es NH₂-Cys-Ala-Ala-Gly-Gly-Gly-Ala-Ala-Ala-Ala-Lys-Pro-Glu-Glu-Ser-Lys-Lys-Glu-Glu-Ala-Lys-COOH.(Mallon, 2013)

El péptido P0 se utiliza como principio activo en la vacuna contra la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* en perros. Este péptido es necesario fusionarlo o conjugarlo con otra molécula, para incrementar su inmunogenicidad o potenciar su efecto protector, pues al ser los péptidos, moléculas de pequeño tamaño y que se degradan relativamente fáciles en el organismo, resultan poco inmunogénicos. De ahí la necesidad de potenciar la inmunogenicidad de los mismos en un candidato vacunal. Se puede inmunopotenciar una molécula pequeña de diversas formas. Por ejemplo, conjugándola a portadores que elevan su inmunogenicidad (Hanes J., 2002).

1.3 Conjugación de péptidos a proteínas portadoras

La reticulación o conjugación es el proceso de unir químicamente dos o más moléculas mediante un enlace covalente (Biosciences, 2014). La conjugación de péptidos a proteínas portadoras es una de las metodologías que se emplean para aumentar la inmunogenicidad del péptido simple en el diseño de vacunas peptídicas (Pérez, 2012). Las técnicas de

conjugación dependen de los grupos activos presentes en los reactivos conectores y de los grupos funcionales presentes en el péptido y en la proteína portadora. Los aminoácidos que contienen cadenas laterales ionizables, Asp, Glu, Lys, Arg, Cys, His, Tyr, son los que están involucrados en los procesos de conjugación (Pérez, 2012).

1.3.1 Grupos funcionales reactivos en proteínas portadoras

La selección de la proteína portadora es importante para lograr la funcionalidad del conjugado. Debe ser una proteína altamente inmunogénica y soluble. A pesar de la complejidad de la estructura de las proteínas, incluyendo la composición y la secuencia de 20 aminoácidos diferentes, existe un pequeño número de aminoácidos con grupos funcionales que participan en los procesos de conjugación. De hecho solo cuatro grupos funcionales son los que participan en la mayoría de las técnicas de conjugación (Douglas Hayworth, 2015).

- **Las aminas primarias (-NH₂):** Este grupo existe en el N-terminal de cada cadena polipeptídica (llamada alfa-amina) y en la cadena lateral de (Lys,) y los residuos de lisina. Debido a su carga positiva en condiciones fisiológicas, las aminas primarias son generalmente orientadas hacia el exterior (es decir, en la superficie exterior) de las proteínas; por lo tanto, por lo general son accesibles para la conjugación sin desnaturalizar la estructura de proteínas.
- **Carboxilos (-COOH):** Este grupo existe en el C-terminal de cada cadena de polipéptido y en las cadenas laterales de ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu). Como las aminas primarias, los grupos carboxilos se encuentran por lo general en la superficie de la estructura de la proteína.
- **Sulfhidrilos (-SH):** Este grupo existe en la cadena lateral de cisteína (Cys). A menudo, como parte de la estructura secundaria o terciaria de una proteína, las cisteínas están unidas entre sus cadenas laterales mediante enlaces disulfuro (-S-S-). Estos se deben reducir a sulfhidrilos para que estén disponibles para la conjugación por la mayoría de los tipos de grupos reactivos.
- **Carbonilos (-CHO):** Cetona o grupos aldehído se pueden crear en glicoproteínas mediante la oxidación de las modificaciones post-traduccionales de polisacáridos (glicosilación) con meta-peryodato de sodio.

1.3.1.1 Proteína portadora BM86

BM86 es una glicoproteína que fue aislada por Willadsen y colaboradores en 1989 a partir de las células de las microvellosidades del intestino de la garrapata *R.microplus* (Tellam et al., 2002) (Nijhof et al., 2010) (Jonsson et al., 2000). Ha sido postulada como el mejor inmunógeno frente al control de la garrapata *R.microplus* que afecta principalmente al ganado vacuno.

El antígeno BM86 forma parte de la familia de proteínas BM86, junto con proteínas propias de otras garrapatas *Ixodes* y *Argasidae* como *Hyaloma marginatum marginatum* (Hm86), *Amblyomma variegatum* (Av86), *Dermacentor reticulatus* (Dr86), *Haemophysalis longicornis* (HI86), *Hyalomma anatolicum* (Haa86), *Ixodes ricinus* (Ir86-1), *Ixodes scapularis* (Is86-2), *Ornithodoros savignyi* (Os86) (Léon, 2012). Esta proteína tiene un peso molecular de 860.000 Da, está conformada por 650 aminoácidos (Willadsen, 2004), se presume que es muy plegada, actualmente se le relaciona con el proceso de endocitosis (Xu et al., 2005)

En la última década del siglo XX, en nuestro país se lanzó al mercado una vacuna que contenía el antígeno recombinante BM86 denominada Gavac®. Esta vacuna ha sido ensayada en pruebas de campo y de laboratorio mostrando una protección superior al 50% (Rodríguez et al., 2001) (2007) (Opdebeeck et al.). Actualmente se sabe que la vacuna Gavac® reduce el uso de acaricidas en un 95%, además de disminuir en 10 veces el índice de hemoparásitos y muertes por estos (Suárez et al., 2009). La protección expresada por la respuesta de anticuerpos que induce la vacunación se va a manifestar por una reducción en el número de garrapatas, el peso y la capacidad reproductiva, se ha demostrado que más del 90% de las garrapatas no puede sobrevivir, en animales inmunizados con tan solo 2µg de BM86 en tres dosis (Rand et al., 1990).

La proteína BM86 se emplea como proteína portadora a la cual se conjuga el péptido P0 para la preparación del principio activo de la vacuna contra la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* en perros. Esta proteína posee 54 lisinas con grupos aminos laterales que pueden actuar como grupos funcionales reactivos para la conjugación al péptido P0. Ha

sido comprobado que cuando el péptido P0 se fusiona al antígeno BM86, el efecto protector del péptido se potencia. Esto pudiera deberse al efecto combinado de los anticuerpos producidos contra ambos inmunógenos, y/o al hecho de que el daño estructural provocado por los anticuerpos dirigidos contra el antígeno BM86, a nivel del intestino de las garrapatas, favorezca la acción de los anticuerpos específicos contra el péptido de la proteína ribosomal P0 (Gonzalez, 2012).

1.3.2 Reactivos de reticulación o conjugación

La conjugación química es una forma especial de modificación química que posee una particular capacidad, sin precedentes para la mutagénesis *in vitro*. Los reactivos de reticulación son utilizados para formar enlaces covalentes entre dos componentes moleculares. Estos componentes pueden ser proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, fármacos, entre otros (Wong, 2000).

Los reactivos de reticulación contienen extremos reactivos a grupos funcionales específicos (aminas primarias, sulfhidrilos, etc.) en las proteínas u otras moléculas. Los agentes reticulantes pueden ser utilizados para la conjugación de péptidos y proteínas que presenten grupos químicos disponibles para la conjugación y son utilizados también comúnmente para modificar ácidos nucleicos, fármacos y superficies sólidas. Los agentes de reticulación se utilizan para estudiar la estructura y composición de las moléculas de proteína así como para estabilizar los posibles cambios de conformación de las proteínas (Pierce, 2013). Estos reactivos conjugantes pueden ser sintetizados por combinaciones de dos o más grupos reactivos en una molécula (ver Tabla1). Cuando se combinan con diferentes tamaños y tipos de brazos espaciadores (llamados así porque definen la distancia entre extremos reactivos específicos), el número de posibles compuestos conjugantes es enorme (Douglas Hayworth, 2015).

Tabla I. Tipo de reactividad y grupos reactivos en agentes de reticulación o conectores cruzados

Tipo de reactividad	Grupos reactivos
Reactivo a grupos carboxilos	<u>Carbodiimida (por ejemplo, EDC)</u>
Reactivo a grupos <u>aminos</u>	<u>Éster de NHS</u> <u>Imidoéster</u>
Reactivo a grupos sulfhidrilos	<u>Maleimida</u> <u>Haloacetilo (bromo- o Yodo-)</u>
Grupos reactivos al aldehído es decir, los azúcares oxidados (carbonilos)	<u>Hidrazida</u> <u>Alcoxiamina</u>

1.3.2.1 Elección del agente de reticulación

Los agentes de reticulación se seleccionan sobre la base de sus reactividades químicas (es decir, la especificidad para determinados grupos funcionales) y de otras propiedades químicas que afectan su comportamiento en diferentes aplicaciones:

- **Especificidad química:** se refiere a la diana reactiva (s) de los extremos reactivos del agente de conjugación. Una consideración general es si el reactivo tiene los mismos o diferentes grupos reactivos en cada extremo (denominado homobifuncionales y heterobifuncionales, respectivamente).
- **La longitud del brazo espaciador:** se refiere a la extensión molecular de un agente de conjugación (es decir, la distancia entre moléculas conjugadas). Una consideración relacionada es si el brazo es escindible (es decir, si el acoplamiento se puede invertir o se rompe cuando se desee).

A menudo los brazos espaciadores de diferentes longitudes son requeridos porque los efectos estéricos dictan la distancia entre los sitios de reacción para la conjugación. Un agente reticulante con un brazo espaciador largo puede ser usado para optimizar la eficiencia de la conjugación. Los agentes reticulantes con brazos espaciadores cortos son usados a menudo para lograr una conjugación

intramolecular, mientras que para lograr una conjugación intermolecular se emplea frecuentemente agentes reticulantes con brazos espaciadores largos (Pierce, 2013).

- **Solubilidad en agua y permeabilidad de la membrana celular** al agente de conjugación. Esto puede provocar que el acoplador pueda penetrar en las células y/o reticular proteínas hidrófobas dentro de las membranas. Estas propiedades están determinadas por la composición del brazo espaciador y/o grupo reactivo.

Muchos agentes reticulantes, por virtud de sus brazos espaciadores hidrofóbicos, tienen una limitada solubilidad en solución acuosa. Estos agentes reticulantes son generalmente disueltos en DMF o DMSO, cuando son añadidos a un sistema biológico o a una solución de biomoléculas para la conjugación (Pierce, 2013).

- **Grupos reactivos espontáneamente o foto reactivos** en un agente de conjugación afectan si reacciona tan pronto como se añade a una muestra o puede ser activado en un momento determinado por la exposición a la luz UV (Douglas Hayworth, 2015).

1.3.2.2 Aplicaciones de los agentes de reticulación

- 1) Estudio de la estructura y funcionalidad de las proteínas.

Los agentes de reticulación son utilizados para el estudio de la estructura y composición de las moléculas de proteínas. Estos permiten responder a preguntas sobre la composición de las subunidades de una proteína, las conformaciones de las proteínas, varios patrones plegables de proteínas y otras. Los agentes reticulantes pueden ser utilizados para estabilizar los cambios de conformación de una proteína (Biosciences, 2014).

Los agentes reticulantes hetrobifuncionales pueden utilizarse para identificar aminoácidos específicos y su posible ubicación dentro de las moléculas. Los agentes reticulantes pueden ser usados para identificar subunidades estructurales. Después de la conjugación la proteína es sujeta a electroforesis de dos dimensiones. Cuando las subunidades son acopladas con un agente reticulante, las moléculas de proteínas migran como una sola banda proteica. Después del acoplamiento agente reticulante-proteína en dos dimensiones, la banda sencilla se resuelve en las subunidades constituyentes (Biosciences, 2014).

Capítulo 1: Marco teórico

pppmn

La concentración de la proteína y del reactivo de conjugación puede traer como resultado una conjugación intermolecular así como una alta concentración del agente reticulante homobifuncional y una solución de proteína diluida favorece la formación de una conjugación intramolecular (Biosciences, 2014).

2) Estudio de la superficie celular

Los agentes reticulantes pueden ser usados con buenos resultados para identificar receptores en la superficie celular. Los agentes reticulantes impermeables a membranas, cuando son usados cuidadosamente y en condiciones controladas, solo reaccionan con moléculas que se encuentran en la membrana celular. Los ésteres-NHS-sulfo son impermeable a las membranas y son una buena elección para la conjugación de proteínas a la superficie celular (Biosciences, 2014).

3) Preparación de inmunotóxicos

Los agentes tóxicos pueden ser acoplados a anticuerpos específicos y utilizados como supuestas toxinas repartidas a sitios específicos dentro de la célula. Los inmunotóxicos son utilizados para matar células específicas como un tumor celular. Estos anticuerpos son a menudo específicos para tumores asociados a antígeno (Biosciences, 2014).

4) Conjugación proteína – proteína

La conjugación proteína – proteína es una de las aplicaciones más comunes de los agentes reticulantes. Esta conjugación es utilizada para la preparación de enzimas acopladas a anticuerpos (Biosciences, 2014). Enzimas como la fosfatasa alcalina y peroxidasa, acopladas a anticuerpos primarios y secundarios están entre las más utilizadas en la conjugación proteína –proteína (Biosciences, 2014).

5) Conjugación de ADN/ARN a proteínas

La conjugación de ADN o ARN a proteínas es más limitada debido a la reactividad de la mayoría de los agentes conjugantes a favor de la conjugación proteína – proteína sobre la conjugación ADN-proteína. Un método de conjugación asistido es que a menudo se sintetiza ADN con grupos aminos primarios o tioles asociados a bases específicas. Después de la inserción de las bases dentro de ADN, los agentes conjugantes reactivos a grupos aminos o sulfhidrilos pueden ser usados para la conjugación a proteínas (Biosciences, 2014).

6) Conjugación de herramientas inmunológicas

La producción de anticuerpos de forma rutinaria se obtiene acoplado haptenos, polipéptidos y péptidos a proteínas portadoras usando una amplia variedad de agentes reticulantes. La selección de un agente reticulante es dictado por el grupo funcional presente en el péptido y la proteína transportadora, esta última generalmente presenta un grupo amino reactivo. Los péptidos generalmente son sintetizados con cisteínas terminales para permitir la conjugación a proteínas transportadoras utilizando agentes reticulantes con grupos sulfhidrilos y amino reactivos (Biosciences, 2014). Esta es la aplicación con que se emplea el conector MPS en el presente trabajo, pues con este conector se conjuga el péptido P0 a la proteína BM86, aprovechando la posibilidad de que estos compuestos presentan grupos sulfhidrilos y amino reactivos respectivamente, para de esta forma conseguir un candidato vacunal con una mayor inmunogenicidad.

1.3.2.3 Agentes reticulantes homobifuncionales

Los primeros agentes reticulantes usados para la modificación y conjugación de macromoléculas consistían en un compuesto bireactivo con igual funcionalidad en ambos extremos, llamados agentes reticulantes homobifuncionales (Wong, 2000). La mayoría de estos reactivos son simétricos con una cadena carbonada espaciadora (brazo espaciador) con ambos grupos reactivos idénticos en sus extremos (Figura 1).

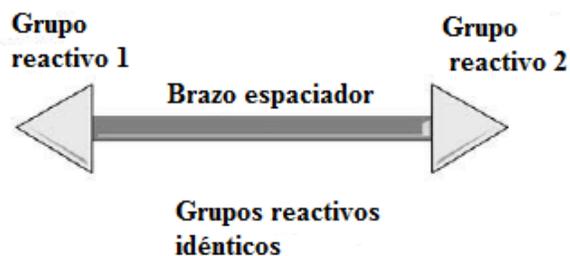


Figura 1. Diseño general de un agente reticulante homobifuncional

Estos reactivos pueden conjugar una proteína a otra reaccionando covalentemente con un grupo común en ambas moléculas. Es por esto que las aminas presentes en las lisinas o las aminas N-terminal de una proteína pueden ser reticuladas al mismo grupo funcional presente en un agente reticulante homobifuncional (Wong, 2000).

La capacidad para conjugar dos proteínas u otras moléculas es diferente para cada sitio de unión específico. La variedad y reactividad de los reactivos homobifuncionales se multiplicó grandemente por la década de 1970 (Hermanson, 2008). Hoy en día existen docenas de agentes reticulantes homobifuncionales comercialmente viables de longitud y reactividad deseada.

La principal desventaja en el empleo de los agentes reticulantes es el gran potencial que tienen para formar un amplio rango de conjugados mal definidos. En la conjugación de dos proteínas, por ejemplo, el agente reticulante puede reaccionar inicialmente con cualquiera de las dos moléculas proteicas formando un intermediario activo y luego la proteína activada puede conjugarse con la segunda proteína o reaccionar con otra molécula del mismo tipo (Hermanson, 2008). También puede reaccionar intramolecularmente con otro grupo funcional de la propia cadena polipeptídica y adicionalmente otra molécula de agente reticulante puede continuar reaccionando con este inmediatamente para formar una mezcla de oligómeros, incluyendo productos polimerizados que igual pueden precipitar (Figura 2).

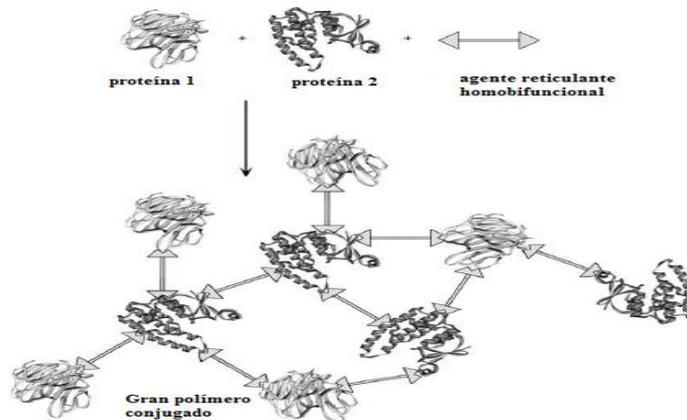


Figura 2. Reacción de conjugación de proteínas usando un agente reticulante homobifuncional en la que puede obtenerse un largo polímero complejo de múltiples tallas e infinitas estructuras

El problema de la peor definición de los productos de conjugación cuando se utilizan agentes reticulantes homobifuncionales está exacerbada en que la reacción procede en un solo paso. Realizar la reacción en un solo paso implica que todos los reactivos son añadidos al mismo tiempo a la mezcla de reacción. Esta técnica proporciona menor control del proceso de conjugación y conduce siempre a multitud de productos, obteniéndose solo un pequeño porcentaje del conjugado deseado. Este problema puede ser disminuido si la reacción se realiza en dos etapas, una de las proteínas se hace reaccionar con el agente reticulante homobifuncional y el exceso de este y de la proteína son removidos. En una segunda etapa la proteína activada se mezcla con la segunda proteína para conjugarla y finalmente ocurre la conjugación (Hermanson, 2008).

Un problema potencial de realizar la conjugación en dos etapas es la posibilidad de que ocurra hidrólisis antes de la adición de la segunda molécula a conjugar. Por ejemplo el éster N-hidroxisuccinimida (NHS) homobifuncional se hidroliza rápidamente y puede degradarse antes de iniciada la segunda etapa de la conjugación. En adición el uso de los agentes reticulantes en dos etapas aun contiene muchos de los problemas asociados a cuando la reacción se hace en una sola etapa, porque la primera proteína puede reticularse y polimerizar con si misma antes de que sea añadida la segunda proteína. En resumen los agentes reticulantes homobifuncionales presentan desafortunadamente una inherente capacidad de polimerizar incontrolablemente (Hermanson, 2008).

1.3.2.4 Agentes reticulantes heterobifuncionales

Los reactivos de conjugación heterobifuncionales cuentan con dos grupos reactivos diferentes que pueden reaccionar con dos grupos funcionales diferentes en proteínas y otras macromoléculas (Figura 3).

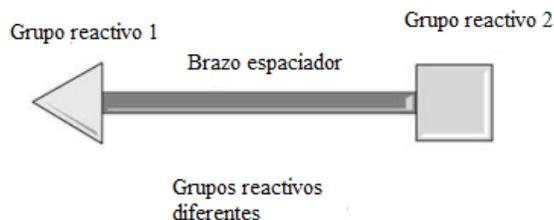


Figura 3. Diseño general de un agente reticulante heterobifuncional

Por ejemplo, un extremo del agente reticulante puede contar con un grupo funcional reactivo a las aminas, mientras que el otro extremo puede contar con un grupo funcional reactivo a los sulfhidrilos. El resultado es que presentan la capacidad para dirigir la reacción de conjugación a los sitios seleccionados de una molécula, de esta manera puede realizarse un mejor control de cada proceso de conjugación (Hermanson, 2008).

Los agentes reticulantes pueden ser usados para la conjugación de proteínas y otras moléculas en un proceso de dos o tres etapas, lo que limita el grado de polimerización que se obtiene si se usara un reticulante homobifuncional. En un proyecto típico de conjugación, una proteína es modificada reaccionándola con un exceso de agente reticulante. Luego la proteína modificada se purifica para eliminar el exceso de reactivo por gel filtración o por una diálisis rápida (Hermanson, 2008).

La mayoría de los agentes reticulantes heterobifuncionales contienen al menos un grupo reactivo que exhibe estabilidad extendida en ambientes acuoso, permitiendo por tanto la purificación del intermediario activado antes de la adición de la segunda molécula a conjugar. Por ejemplo, el éster maleimidopropionico de la N-hidroxisuccinimida (MPS) puede ser utilizado para reaccionar con grupos aminos de una proteína a través de su grupo éster-NHS (el de la funcionalidad más lábil), mientras la actividad funcional del grupo maleimido se preserva. Puesto que el grupo maleimido presenta mayor estabilidad en

Capítulo 1: Marco teórico

solución acuosa que el grupo éster-NHS, se puede crear un intermediario maleimido activado. Después de realizar una etapa rápida de purificación, el extremo maleimido del agente reticulante se usa para conjugar moléculas que posean grupos sulfhídricos (Hermanson, 2008).

La configuración o estructura del conjugado puede ser regulado por la degradación de la primera proteína modificada y por ajuste de la cantidad de la segunda proteína añadida para la reacción de conjugación final. Así, de esta manera pueden ser obtenidos conjugados de alto o de bajo peso molecular para lograr productos con diferentes usos (Hermanson, 2008).

Los agentes reticulantes heterobifuncionales pueden también ser usados para una reacción de conjugación con un sitio particular de una molécula blanco. La conjugación dirigida a menudo es importante en la preservación crítica de epítomos (porción de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario) o sitios activos a lo largo de una macromolécula. Por ejemplo los anticuerpos pueden ser acoplados a otras proteínas mientras la reacción de conjugación sea dirigida fuera de los sitios obligatorios del antígeno, de esta manera se maximiza la actividad del anticuerpo en el conjugado (Hermanson, 2008).

Los reactivos heterobifuncionales que contienen un extremo fotoreactivo pueden ser usados para insertar dentro una molécula blanco no selectivamente por radiación UV. Los grupos fotoreactivos son estables hasta exposiciones a alta intensidad de luz UV (Hermanson, 2008).

El tercer componente de todo reactivo heterobifuncional es el brazo espaciador que mantiene unidos en sus extremos los dos grupos reactivos. Los agentes conjugados pueden ser seleccionados basándose no solo en sus reactividades, sino en la longitud y el tipo de brazo espaciador que posee. Algunas familias de agentes heterobifuncionales se diferencian solamente en la longitud de su brazo espaciador. La naturaleza de los brazos espaciadores puede también gobernar totalmente la hidrofiliidad del agente conjugante. Además un grupo de heterobifuncionales contienen brazos espaciadores que le generan mayor flexibilidad para el diseño experimental. Existen también una pequeña cantidad de agentes reticulantes contienen brazos espaciadores peculiares que afectan la reactividad de sus grupos

funcionales. En adición los conjugantes destinados para uso in vivo pueden tener diferentes propiedades dependiendo del tipo de brazo espaciador asociado al agente reticulante. Algunos espaciadores pueden tener inmunogenicidad y causar la producción de algún anticuerpo específico. En otras instancias, el tiempo de vida medio de un conjugado in vivo puede estar alterado por el tipo de brazo espaciador que posea (Hermanson, 2008).

En resumen, los agentes conjugantes heterobifuncionales son comercialmente más viable que los heterobifuncionales debido a que estos reactivos no sólo permiten una sola etapa de conjugación de moléculas que tienen los respectivos grupos funcionales de destino, sino que también permiten (en dos etapas) conjugaciones secuenciales que minimizan la polimerización indeseable o auto-conjugación. En los procedimientos secuenciales, los reactivos heterobifuncionales se hacen reaccionar con una proteína utilizando el grupo más lábiles del agente de conjugación primero (Douglas Hayworth, 2015). Después de eliminar el exceso de agente de conjugación no reaccionado, se añade la primera proteína modificada a una solución que contiene la segunda proteína ocurriendo la reacción a través del segundo grupo reactivo del agente de conjugación. Los agentes de conjugación heterobifuncionales más utilizados son aquellos que tienen un éster de N-hidroxisuccinimida reactivo (es decir, éster de NHS) en un extremo y un grupo sulfhidrilo reactivo (por ejemplo, maleimido) en el otro extremo. Debido a que el grupo NHS-éster es menos estable en solución acuosa, por lo general se hace reaccionar a una proteína primero (Chamow S.M., 2005). Si la segunda proteína no tiene grupos sulfhidrilo nativos disponibles, estos se pueden añadir en una etapa previa.

1.3.2.5 MPS como conector cruzado heterofuncional

Uno de los conectores cruzados heterofuncionales más empleado en la actualidad es el éster maleimidopropionico de la N-hidroxisuccinimida (MPS), según la IUPAC (*3-(2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il) propanoato de 2,5-dioxopirrolidina-1-il*) (ver figura 4) el cual será empleado durante este trabajo para lograr acoplar la proteína BM86 al péptido P0.

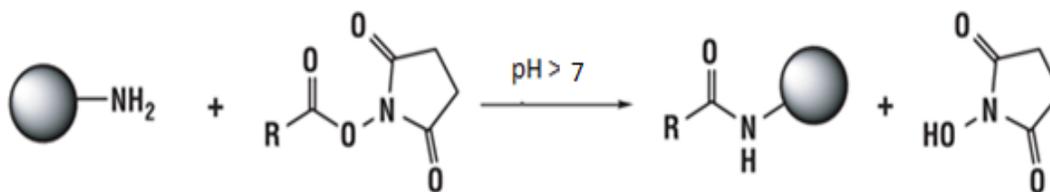


Figura 5. Reacción de grupos aminos primarios con ésteres de NHS

La hidrólisis de los ésteres NHS compite con las reacciones con aminos primarias. La hidrólisis de este grupo se incrementa con el aumento del pH y ocurre más rápidamente en soluciones diluidas de proteínas. Estudios realizados en ésteres NHS indican que el tiempo de vida medio de la hidrólisis para compuestos homobifuncionales de ésteres-NHS es de 4 a 5 horas a $\text{pH} = 7$ °C y 0 °C en medios acuosos libre de aminos primarias, este tiempo decrece a 10 minutos $\text{pH}=8.6$ y 4 °C. La extensión de la hidrólisis de los ésteres de NHS en solución acuosa libre de aminos primarias puede ser medida a 260 nm, pues a esta longitud de onda se produce un aumento de la absorbancia a medida que se liberan moléculas de NHS. El coeficiente de extinción molar de las moléculas NHS liberadas por hidrólisis o por reacción con compuestos nucleófilos es $8.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 260 nm y $\text{pH}=9$ mientras que el coeficiente de extinción molar de los ésteres-NHS en buffer fosfato de potasio (50 mM), $\text{pH}=6.5$ es $7.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 260 nm (Pierce, 2013).

Es necesario evitar tampones que contengan aminos primarias cuando se utilizan agentes reticulantes con ésteres-NHS, pues estos pueden competir con la reacción de conjugación. El tris(hidroximetil)aminometano (Tris) es uno de los tampones que debe evitarse en estas reacciones de conjugación debido a que presenta en su estructura un grupo amino primario. Un gran exceso de Tris a un pH entre neutro y básico puede ser añadido al final de la reacción de conjugación para detenerla. La glicina también cuenta con una amina primaria en su estructura y por tanto puede ser utilizada con esta misma finalidad. El éster-NHS reacciona comúnmente con grupos aminos primarios a un pH entre 7 y 9 a 4°C durante 2 horas y durante 30 minutos a temperatura ambiente (Pierce, 2013). El tiempo de reacción empleada a 4°C se dobla o cuadruplica a temperatura ambiente para poder lograr igual eficiencia. También es necesario tener en cuenta la concentración de la proteína a conjugar con agentes de reticulación que presenten ésteres-NHS, los valores de concentración se

deben encontrar por encima de 10 μM (50-100 μM es la concentración óptima) porque mientras más diluida este la solución de la proteína es más probable que ocurra la hidrólisis de este agente reticulante (Pierce, 2013).

Los ésteres de NHS pueden dividirse en dos clases con igual reactividad de los grupos aminos primarios: soluble en agua e insoluble en agua. Los ésteres de NHS solubles en agua presentan un grupo sulfonato ($-\text{SO}_3$) en el anillo N-hidroxisuccinimida. La reacción con los sulfo-NHS-ésteres usualmente ocurre en un 100% en solución acuosa, sin embargo es posible lograr una mayor solubilidad cuando este reactivo es disuelto en solventes orgánicos como el dimetilsulfóxido (DMSO). Los ésteres-NHS que no presentan grupos sulfonatos son insolubles en agua y es necesario primero disolverlos en un solvente orgánico miscible en agua como el DMSO y el DMF (Pierce, 2013).

1.3.2.5.2 Maleimido

El maleimido es un derivado de la reacción del anhídrido maleico con un derivado de amina. Su grupo funcional es muy común en muchos agentes reticulantes heterobifuncional. El grupo maleimido reacciona con los grupos sulfhidrilos cuando el pH de la mezcla de reacción esta entre 6,5 y 7,5 y forma un enlace tioéter estable que no es reversible (figura 3). Uno de los carbonos adyacentes al doble enlace del maleimido sufre ataque nucleofílico por el anión tiolato generando un producto de adición.

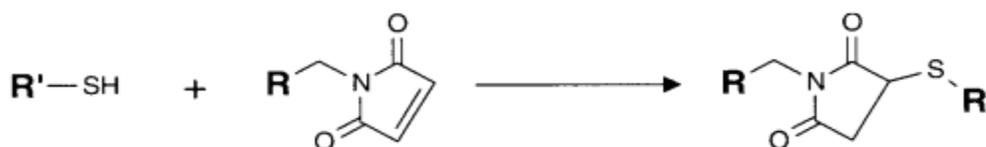


Figura 6. Reacción del grupo maleimido con grupos sulfhidrilos.

A pH neutro el grupo maleimido reacciona con los sulfhidrilos 1000 veces más rápido que con los grupos aminos, pero a pH mayor que 8.5 la reacción se favorece para las aminos primarias (Hermanson, 2008). El maleimido no reacciona con las tirosinas, histidinas o metioninas. El grupo maleimido también puede sufrir hidrólisis perdiendo la reactividad por los grupos sulfhidrilos. La hidrólisis también puede ocurrir después de acoplado los

sulfhidrilos al maleimido. La reacción con el anillo abierto puede llegar a ser más rápido a pH elevados. Los tioles deben ser excluidos de los buffer de reacción cuando están presentes los grupos maleimidos porque pueden competir con los sitios de acoplamiento. Los grupos sulfhidrilos deben estar reducidos para que puedan reaccionar con el maleimido, pues estos tienden a formar puentes disulfuros. El EDTA puede ser incluido en el buffer de acoplamiento para minimizar la oxidación de los sulfhidrilos (Pierce, 2013)

1.3.3 Mecanismo de conjugación de la proteína BM86 al péptido P0 empleando MPS

La conjugación con este tipo de reactivo se realiza en dos o tres pasos, con lo cual se elimina la polimerización que se obtiene con el empleo de los reactivos homobifuncionales (figura 7). En una primera etapa el grupo reactivo NHS-éster reacciona con el grupo amino primario de las lisinas presentes en la proteína en condiciones ligeramente alcalinas (pH 7,2 a 8,5) para producir enlaces amida estable. La reacción libera N-hidroxisuccinimida (NHS) que se puede eliminar fácilmente por diálisis o desalinización (Chamow S.M., 2005). En una segunda etapa el péptido reacciona específicamente por los grupos sulfhidrilos de las cisteínas en condiciones casi neutras (pH 6,5 a 7,5) para formar enlaces tioéter estables con el grupo maleimido presente en el conector unido a la proteína. Los enlaces disulfuro en las estructuras de proteínas (por ejemplo, entre cisteínas) deben ser reducidos a tioles libres (sulfhidrilos) para reaccionar con reactivos maleimida. Tioles extraños deben ser excluidos de tampones de reacción con grupos maleimidos, porque van a competir por los sitios de acoplamiento (Chamow S.M., 2005). Finalmente se realiza otro paso de diálisis para eliminar el exceso de reactivo que no se conjugó.

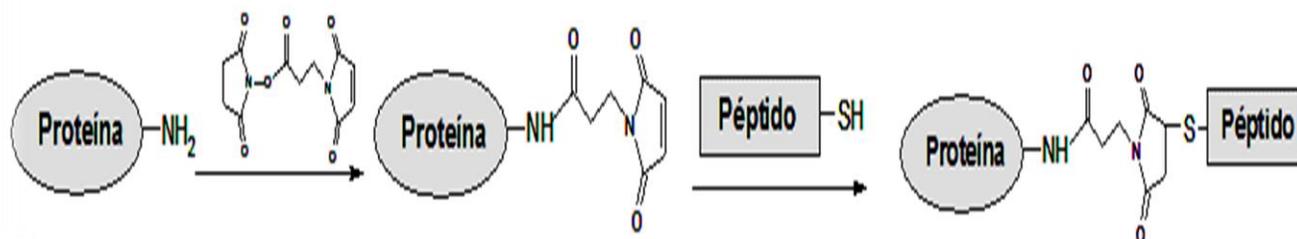


Figura 7. Mecanismo de reacción del MPS con una proteína por el éster de N-hidroxisuccinimida y con un péptido por el grupo maleimido.

1.4 Condiciones generales de reacción

En muchas aplicaciones, es necesario mantener la estructura nativa de la proteína compleja, por lo que la conjugación generalmente se lleva a cabo utilizando condiciones casi fisiológicas. Las relaciones molares óptimas proteína-conector para realizar la conjugación deben determinarse empíricamente. Dependiendo de la aplicación, el grado de conjugación es un factor importante. Por ejemplo, al preparar conjugados de inmunógeno, se desea un alto grado de conjugación para aumentar la inmunogenicidad del antígeno. Sin embargo, cuando la conjugación es a un anticuerpo o una enzima, un grado de conjugación de bajo a moderado puede ser óptimo para que se retenga la actividad biológica de la proteína (Gonzalez et al., 2010).

El número de grupos funcionales en la superficie de la proteína también es importante a considerar. Si la proteína presenta numerosos grupos reactivos, se puede emplear una menor proporción proteína-conector. Para un número limitado de grupos reactivos en la proteína se hace necesaria una mayor relación proteína-conector. La relación péptido-proteína se determina por análisis de aminoácidos (AAA), por MALDI-MS, o mediante la cuantificación de grupos reactivos en la proteína portadora antes y después de la conjugación (Gonzalez et al., 2010).

Si al conector MPS se le hace reaccionar con β -mercaptoetanol en exceso de modo que permanezcan grupos sulfhidrilos libres y teniendo en cuenta que el péptido P0 posee también grupos sulfhidrilos libres, a la reacción de conjugación del péptido P0 a la proteína BM86, se le pudiera dar seguimiento utilizando la determinación de grupos sulfhidrilos libres. Uno de los ensayos más difundido que se emplea con este fin es el ensayo de Ellman.

1.5 Ensayo de Ellman

En 1959 Ellman introdujo el compuesto 5,5'-ditio-bis- (ácido 2-nitrobenzoico) (Ellman, 1959) , también conocido como DTNB, como un compuesto soluble en agua versátil para la cuantificación de grupos sulfhidrilos libres en solución (Figura 8). La masa molecular de este compuesto es 396,3g/mol (Biotecnology, 2004).

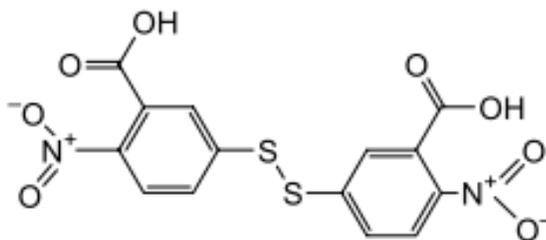


Figura 8. Estructura del reactivo de Ellman.

Una solución de este compuesto cuando reacciona con sulfhidrilos produce un producto de color amarillo medible. En consecuencia, el reactivo de Ellman es muy útil como un reactivo de ensayo de sulfhidriilo debido a su especificidad para grupos -SH a pH neutro, de alto coeficiente de extinción molar y tiempo de reacción corto (Biotecnology, 2004). DTNB reacciona con un grupo sulfhidriilo libre para dar un disulfuro mixto y el ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB) (Figura 2). Esta reacción es rápida y estequiométrica, pues con la adición de un mol de tiol se libera un mol de TNB.

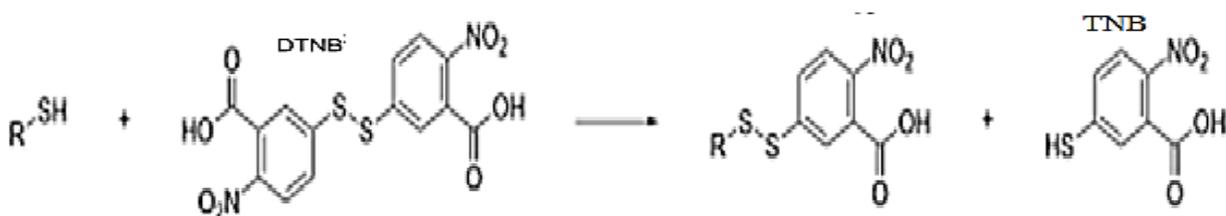


Figura 9. Reacción del reactivo DTNB con grupos sulfhidrilos libres para producir un sulfhidriilo mixto y el compuesto TNB

El objetivo del reactivo DTNB en esta reacción es la base conjugada ($R-S^-$) de un grupo sulfhidriilo libre. Por tanto es muy importante que el compuesto a analizar que presenta grupos sulfhidrilos no se encuentre formando puentes disulfuros, si esto es así, es necesario reducirlos primero con un agente reductor como el borohidruro de sodio, β -mercaptoetanol, hidruro de litio y aluminio u otro. TNB es la especie "de color" producidos en esta reacción y tiene un alto coeficiente de extinción molar en el intervalo visible. El coeficiente de extinción molar de TNB informado originalmente fue $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 412 nm y pH 8,0 (Biotecnology, 2004). En consecuencia, este valor se ha citado con frecuencia en la literatura. Estudios posteriores han demostrado, sin embargo, que el coeficiente de

Capítulo 1: Marco teórico

pppmn

extinción molar se refleja con mayor precisión por un valor de $14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 412 nm. El coeficiente de extinción molar del compuesto TNB no se ve afectada por cambios en el pH entre 7,6 y 8,6. Sin embargo, la extinción de TNB es diferente en otros disolventes (Tabla II). Los grupos sulfhidrilos pueden estimarse en una muestra por comparación con una curva estándar compuesta de concentraciones conocidas de un compuesto que contiene sulfhidrilo tales como cisteína, β -mercaptoetanol u otro compuesto (Biotecnology, 2004).

Tabla II. Coeficientes de extinción molar del reactivo de Ellman en varios solventes

Solventes	ϵ a 412 nm
2% SDS	12500
Tampón fosfato 0.1M,ph=8, EDTA1mM	14150
Hidrocloreuro de guanadina 6M	13880
Urea 8M	14290

La velocidad de reacción del ensayo de Ellman depende de varios factores:1) el pH de la reacción, 2) el pKa del sulfhidrilo y 3) estérico y efectos electrostáticos (Riddles, 1983). Esto significa que se requiere un pH de reacción de al menos 7,0 normalmente. Sin embargo, a este pH el anión tiolato también pueden participar en reacciones secundarias no deseadas, tales como alquilación y reacciones de oxidación. Esto es particularmente un problema cuando se lleva a cabo la reacción de DTNB en muestras en las que varias especies redox-activo están presentes. Otro inconveniente del ensayo DTNB convencional es que sufre de una sensibilidad algo limitada, con un límite de detección de aproximadamente 3 mM. (Hansen and Winter, 2007). Por consiguiente, no es adecuado para la cuantificación de las muestras que contienen bajas concentraciones de tioles tales como soluciones de proteína diluidas (Hansen and Winter, 2007).

Capítulo 1: Marco teórico

pppmn

El reactivo de Ellman puede ser usado para distintas aplicaciones de la estimación de sulfhidrilos en solución. Se ha utilizado para la determinación de tioles alquílicos por HPLC usando un procedimiento de derivatización pre-columna y para estudiar tioles en el sitio activo de varias enzimas, incluyendo tiolasa, sintasa de ácidos grasos y mevalonato 5-difosfato descarboxilasa. El reactivo de Ellman se puede utilizar para la medición de los tioles en compuestos de bajo peso molecular tales como glutatión y muestras biológicas, como por ejemplo, sangre. También se puede medir el número de grupos tiol en las proteínas. El reactivo de Ellman comercial puede no ser completamente puro, por lo que puede requerir la recristalización para obtener resultados totalmente exactos y reproducibles (Sigma-Aldrich, 2005).

Capítulo 2: Materiales y Métodos

2.1 Procedimiento experimental

2.1.1 Obtención de la curva de calibración empleando el método de Ellman

Para la obtención de una curva de calibración empleando el método de Ellman se utilizó como patrón el β -mercaptoetanol, debido a que este compuesto presenta grupos sulfhidrilos libres y por tanto puede ser evaluada su concentración mediante su reacción con el reactivo de Ellman. Para la obtención de la curva de calibración, primeramente se preparó una solución madre de β -mercaptoetanol de concentración 1,5 mmol/L disuelto en tampón fosfato pH=6,5. Luego a partir de esta solución se prepararon diferentes disoluciones cada vez más diluidas (Tabla III).

Tabla III. Disoluciones de diferentes concentraciones de β -mercaptoetanol empleadas para realizar la curva de calibración

Conc, B-mercaptoetanol (mM)	Volumen de Tampón fosfato pH=6,5, EDTA 5mM (μ L)	Volumen de solución de β -mercaptoetanol 1,5 mM (μ L)
1,5	0	1000
1,25	170	830
1,0	335	665
0,75	500	500
0,5	665	335
0,25	830	170
0(blanco)	1000	0

Se realizó el ensayo de Ellman para cada una de estas disoluciones de β -mercaptoetanol, según el protocolo Pierce 22582 (Biotechnology, 2004) mezclando para ello en una placa de 96 pocillos: 200 μ L de tampón fosfato pH=8; 20 μ L de cada una de las disoluciones de β -mercaptoetanol y 5 μ L del reactivo de Ellman ($c = 0,01$ mol/L). Se realizaron tres réplicas de cada ensayo. Se esperó un tiempo de reacción de 15min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 412 nm en el Multiskan FC (340nm-850nm) versión 1,0094 de la firma Fisher Thermo Scientific (Finlandia). La forma en que se realizó el ensayo de Ellman

durante todo el trabajo fue siempre la misma, considerando que los 20 μL fueron siempre de la muestra a analizar. Luego se realizó una curva de calibración de β -mercaptoetanol graficando la absorbancia obtenida mediante el ensayo de Ellman contra la concentración de este reactivo en cada dilución. En cada ocasión que se aplicó el ensayo de Ellman, se realizó una nueva curva de calibración de β -mercaptoetanol.

2.1.2 Cuantificación del número de moléculas de MPS activas

Para la cuantificación del número de moléculas de MPS activas se realizaron reacciones entre el β -mercaptoetanol y el conector MPS en diferentes relaciones molares, de forma tal que el β -mercaptoetanol se encontrara en exceso. Después de 3 horas de reacción, se realizó el ensayo de Ellman para cuantificar este exceso de β -mercaptoetanol y luego por diferencia determinar los moles de β -mercaptoetanol que reaccionaron, lo que es igual a los moles de MPS que reaccionaron. Se preparó con este propósito una solución de MPS de concentración 0,039 mol/L utilizando DMF como disolvente y una solución de β -mercaptoetanol de concentración 1,5 mmol/L disuelta en tampón fosfato de sodio de pH=6,5. Las cantidades que fueron mezcladas en las diferentes reacciones se muestran en la tabla IV.

Tabla IV. Cantidades del reactivo MPS y de β -mercaptoetanol empleadas en las reacciones de cuantificación de las moléculas de MPS activas.

Reacción de MPS con β -mercaptoetanol	mol β -mercaptoetanol / mol MPS	Volumen (μL) de MPS(conc=0,039 mol/l)	Volumen (mL) de β -mercaptoetanol (conc=1,5mmol/L)
A	3,8	10	1
B	1,92	20	1
C	1,28	30	1
D	1	39	1

Se evaluó además la formación de puentes disulfuros en el β -mercaptoetanol en el tiempo pues la reacción con el MPS se lleva a cabo en 3 horas. Para ello se realizó el ensayo de Ellman a la disolución de β -mercaptoetanol 1,5mmol/L cada determinado intervalo de tiempo (1h-48h).

2.1.3 Cuantificación del péptido P0 en forma de monómero

Para cuantificar el péptido P0 en forma de monómero se utilizó directamente el ensayo de Ellman debido a que este péptido posee un grupo -SH perteneciente a la cisteína del extremo N-terminal del mismo. Con este propósito, se preparó una solución de P0 de concentración 1,5 mmol/L disuelta en tampón fosfato de sodio pH=6.5, debido a que a este pH es que se disolvió el péptido cuando se llevó a cabo la reacción con el grupo maleimido del conector MPS. Además se preparó otra solución de P0 de igual pH y concentración, pero esta vez disuelta en buffer fosfato de sodio desoxigenado mediante el burbujeo de nitrógeno gaseoso durante 1 hora a flujo constante. Para realizar el ensayo de Ellman se procedió como fue descrito en el epígrafe 2.1.1, solo que esta vez el volumen de muestra fue 20 μ L de péptido P0 de concentración 1,5 mmol/L. Se realizaron tres réplicas del ensayo de Ellman para la cuantificación del péptido P0 en forma de monómero.

2.1.4 Evaluación de la formación de puentes disulfuros en el péptido P0

Se evaluó la formación de puentes disulfuros en el péptido P0 a través del tiempo, cuando este se disolvió en buffer fosfato desoxigenado y cuando se disolvió en buffer fosfato sin desoxigenar. Este estudio se realizó con el propósito de determinar la influencia en el proceso de dimerización del péptido P0, del oxígeno disuelto en el buffer, y de esta forma determinar en qué circunstancias el péptido era más estable a la formación de puentes disulfuros. Para ello se prepararon dos soluciones de P0 1,5 mmol/L utilizando como disolvente en una de ellas el buffer desoxigenado y en la otra el buffer sin desoxigenar y se realizó el ensayo de Ellman, cada determinados intervalos de tiempo. Se realizaron tres réplicas del ensayo de Ellman para cada intervalo de tiempo en que se analizó el péptido P0. Este estudio se realizó a temperatura ambiente, pues a esta temperatura es a la que se llevó a cabo la conjugación del péptido P0 a la proteína BM86.

2.1.5 Conjugación del Péptido P0 a la proteína BM86 (primera etapa)

Para realizar la conjugación del péptido P0 a la proteína BM86 se procedió en dos etapas. La primera etapa consistió en la reacción entre el conector MPS y los grupos aminos de las

Capítulo 2: Materiales y Métodos

lisinas presentes en la proteína BM86. La segunda etapa consistió en la reacción entre el grupo maleimido del conector MPS y los grupos -SH del péptido P0.

En el presente epígrafe se describe como se procedió en la primera etapa de conjugación. Primeramente se realizó una curva de calibración de β -mercaptoetanol, la cual se empleó durante toda la conjugación. Este proceso de conjugación se realizó para proteínas BM86 provenientes de tres lotes de fermentación diferentes, a las cuales se hará referencia a partir de ahora como BM86 (1), BM86 (2), BM86 (3).

2.1.5.1 Reacción del MPS con la proteína BM86

Las cantidades de la proteína BM86 y el conector MPS que fueron mezcladas en la primera etapa de conjugación de forma tal que exista una relación aproximada de 5mg de proteína por cada 1 mg de conector MPS garantizando así que exista MPS en exceso, se muestran en la tabla V para BM86 (1), BM86 (2) y BM86 (3) .

Tabla V. Cantidades de BM86 y MPS mezcladas en la primera etapa de conjugación.

Proteína	V(BM86)	V (MPS conc= 0,039mol/L)
	(ml)	(μ L)
BM86(1) c=3,5 mg/ml	5	350
BM86(2) c= 4,15mg/mL	5	427
BM86(3) c=3,34 mg/mL	5	350

La reacción entre el MPS y la proteína BM86 se realizó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

2.1.5.2 Cuantificación del MPS que reacciona con la proteína BM86

Para determinar los moles de MPS que reaccionaron con la proteína BM86 en la primera etapa de conjugación, se procedió primero a cuantificar el MPS en exceso. Luego, por diferencia entre el número de moles de MPS inicial y el número de moles de MPS en exceso se determinó los moles de MPS que reaccionaron.

Transcurrido los 30 minutos de reacción entre el MPS y la proteína BM86 se procedió a cuantificar el exceso de MPS. Con este propósito se tomaron 400 μ L de esta mezcla de

Capítulo 2: Materiales y Métodos

reacción y se filtraron con filtros de tamaño de poro 30 KDa durante 10 min con ayuda de la centrifuga Centrifuge 5415C. Mediante esta operación se separó el exceso de MPS resultante de esta reacción. Luego, de la solución filtrada se tomaron 143 μ L y se le añadió 1ml de β -mercaptoetanol, dejándolo reaccionar durante 3horas, para proceder a cuantificar mediante el ensayo de Ellman, el exceso de β -mercaptoetanol y con ello el MPS en exceso de la conjugación. Utilizando para esta cuantificación la curva de calibración de β -mercaptoetanol obtenida tal y como fue explicada en el epígrafe 2.1.1.

2.1.5.3 Separación del MPS en exceso para realizar la segunda etapa de conjugación

Para poder realizar la conjugación del péptido P0 es necesario que todo el exceso de MPS de la reacción MPS-BM86 haya sido separado para evitar que el péptido reaccione con grupos maleimidos del conector MPS que no esté unido a la proteína BM86. Para lograr separar este exceso de MPS se utilizó una columna de gel filtración PD-10 Desalting Columns (tabla VI).

Tabla VI. Características de la columna PD-10 Desalting Columns.

Matriz	Sephadex G-25 Medium
Volumen máximo de muestra	2,5 ml
Volumen para la elución de la muestra por gravedad	3,5ml
Límite de exclusión	5000 Da
Capacidad de separación mediante gravedad	> 98%
Rango de pH de trabajo	2-13

La fase móvil que se empleó fue el mismo buffer fosfato de sodio pH 6,5 en el cual se llevó a cabo la próxima etapa de conjugación. Para lograr separar el exceso de MPS el volumen de muestra empleado fue 2,5 ml el cual se eluyó con 3,5 ml de buffer fosfato de sodio pH 6,5 por gravedad, de manera que la muestra presentó un factor de dilución de 1,4.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

2.1.5.4 Comprobación mediante HPLC por exclusión molecular de la separación del MPS en exceso

La muestra que se eluyó por la columna de gel filtración PD-10 Desalting Columns se analizó por HPLC por exclusión molecular con detector de absorbancia a 280 nm y una columna Superose 6 (tabla VII) para comprobar que no quedó MPS en exceso y que la muestra estaba en condiciones para realizar la reacción con el péptido P0. El cromatograma obtenido se comparó con el realizado a la proteína BM86 sin conjugar para determinar la efectividad de la separación del MPS sin reaccionar. Este procedimiento se hizo solamente con fines cualitativos.

Tabla VII. Características de la columna Superose 6 de HPLC por exclusión molecular.

Matriz	Agarosa
Límite de exclusión	$4 \cdot 10^7$ Da
Tamaño de partícula promedio	13 μ m
Estabilidad (pH)	3-12
Estabilidad (Temperatura)	4°C- 40°C
Flujo	0,1 - 0,5ml/min
Presión máxima	15 bar

2.1.6 Conjugación del Péptido P0 a la proteína BM86 (segunda etapa)

En la segunda etapa de la conjugación, se procedió primeramente a cuantificar el P0 inicial a reaccionar, mediante el ensayo de Ellman tal y como fue descrito en 2.1.3. Para ello se preparó una solución de P0 de concentración 10mg/ml disuelta en buffer fosfato desoxigenado pH=6,5. De esta solución se tomaron 20 μ L para realizarle el ensayo de Ellman, mientras que paralelamente se tomaron 700 μ L de esta misma solución de P0 (para garantizar que haya un exceso de P0) y se hizo reaccionar durante 3 horas a temperatura ambiente con 1ml de la solución BM86-MPS filtrada. Estas cantidades fueron iguales para las proteínas BM86 provenientes de los tres lotes de fermentación. Transcurrido este tiempo se tomaron de la mezcla de reacción 400 μ L y se filtraron con filtros de tamaño de poro 30 kDa. Con este procedimiento se logró separar el exceso de péptido P0. De esta

solución filtrada que contenía el péptido P0 en exceso se tomó 20 μL y se realizó el ensayo de Ellman para cuantificarlo.

2.1.7 Análisis estadístico y procesamiento de datos

El análisis estadístico para la comparación de muestras se realizó con ayuda del software Statgraphics Centurion XVI, Versión 16.1.11 (StatPoint Technologies, Inc.) y del software Graph Prism 6, Versión 6.01 (GraphPad Software, Inc.). Para el análisis estadístico y procesamiento de datos se empleó también Microsoft Excel. El análisis de regresión para la obtención de las curvas de calibración de β -mercaptoetanol se realizó por el método de los mínimos cuadrados. El software Biocrom fue empleado para el procesamiento de los cromatogramas obtenidos por HPLC por exclusión molecular.

Capítulo 3. Resultados y Discusión

3.1 Curva de calibración para el ensayo de Ellman

Para la obtención de la curva de calibración de β -mercaptoetanol se realizaron tres réplicas del ensayo de Ellman a cada una de las disoluciones de este compuesto mostradas en la tabla III. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla VIII.

Tabla VIII. Datos obtenidos al realizar ensayo de Ellman a las disoluciones de diferentes concentraciones de β -mercaptoetanol.

Conc β -mercaptoetanol (mmol/L)	Abs promedio (β -mercaptoetanol)
1,5	1,705
1,25	1,411
1	1,1565
0,75	0,8505
0,5	0,5825
0,25	0,2785
0	0

Con los datos de absorbancia obtenidos al realizar el ensayo de Ellman para las diferentes diluciones realizadas a la solución madre de β -mercaptoetanol, se calculó empleando la ley de Lamber-Beer la concentración que realmente reflejan estos valores de absorbancia. Para ello es necesario tener en cuenta que la longitud del camino óptico en este caso fue de 0,9cm, el coeficiente de extinción molar del reactivo de Ellman según el solvente en el que se encuentra es de 14500 M^{-1} y el factor de dilución de las muestras analizadas fue 11,25. Luego, se determinó la desviación que existe entre los valores de concentraciones reales a los que fue preparada la solución de β -mercaptoetanol y los valores determinados mediante la ley de Lamber-Beer. Los resultados obtenidos para el β -mercaptoetanol se muestran en la tabla IX.

Capítulo 3: Resultados y Discusión

Tabla IX. Datos de concentración real de las diferentes diluciones de β -mercaptoetanol y los correspondientes valores de concentraciones obtenidos a partir de la ley de Lamber-Beer.

Conc real de β -mercaptoetanol (mmol/L)	Conc a través de la ley de Lamber-Beer (mmol/L)	Desviación de la conc medida del valor real
1,5	1,51	0,007
1,25	1,25	0,00
1	1,02	0,02
0,75	0,75	0,00
0,5	0,51	0,02
0,25	0,25	0,00
0	0,00	0,00

De esta forma se obtiene que en el compuesto β -mercaptoetanol hay una desviación menor o igual del 2% de la concentración obtenida a partir del empleo de la ley de Lamber-Beer aplicada a las absorbancias obtenidas al realizar el ensayo de Ellman y la concentración real a la que fue preparada la disolución. En conclusión, se puede emplear el β -mercaptoetanol como patrón en la obtención de la curva de calibración del ensayo de Ellman. Con los resultados obtenidos en la tabla IX se construyó por tanto, la curva de calibración de β -mercaptoetanol para el ensayo de Ellman, graficando para ello, la concentración de cada una de las disoluciones de β -mercaptoetanol en mmol/L contra la absorbancia obtenida a 412nm al realizar este ensayo. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 10.

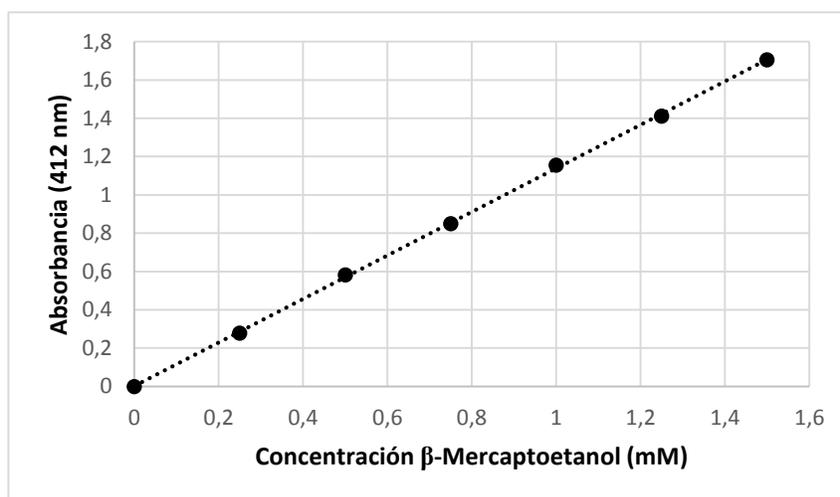


Figura 10. Curva de calibración de β -mercaptoetanol obtenida a partir de los datos mostrados en la tabla VIII.

Capítulo 3: Resultados y Discusión

La ecuación de correlación obtenida fue $A = 1,1363c + 0,0026$ con un coeficiente de determinación de 0,9997, mostrando resultados muy similares a los obtenidos por Mayra Wood y colaboradores (Wood et al., 2014). Los resultados obtenidos demuestran que existe una correlación satisfactoria entre la absorbancia obtenida aplicando el ensayo de Ellman y la concentración de β -mercaptoetanol. Los resultados corroboran que el método de Ellman muestra una capacidad satisfactoria para la cuantificación de los grupos $-SH$ libres. En lo adelante se realizaron nuevas curvas de calibración del β -mercaptoetanol cada vez que se empleó el ensayo de Ellman para cualquier análisis.

3.2 Cuantificación de las moléculas de MPS activas

El β -mercaptoetanol se empleó para reaccionar con MPS y así de forma indirecta poder cuantificar este último. Como la reacción entre el grupo maleimido y los grupos $-SH$ libres tarda aproximadamente 3 horas a temperatura ambiente, se evaluó la formación de puentes disulfuros en el β -mercaptoetanol. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla X.

Tabla X. Concentración de β -mercaptoetanol libre en el tiempo.

Tiempo (h)	0	1	2	3	6	24	26	48
Conc(β mercaptoetanol) (mM)	1,4947	1,4964	1,4964	1,5008	1,4947	1,4964	1,4956	1,4973
	1,4982	1,4982	1,4947	1,4947	1,5008	1,4956	1,4964	1,4956
	1,4982	1,4982	1,5008	1,4973	1,4982	1,4991	1,5008	1,5000

Mediante el software STATGRAPHICS Centurion se realizó un análisis estadístico para la comparación de las concentraciones obtenidas para el β -mercaptoetanol en los diferentes tiempos, mostrado en la tabla X. Se obtuvo mediante el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher que no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos de absorbancia de β -mercaptoetanol en el tiempo, con un nivel de confianza del 95% (anexo 1). Con este análisis estadístico se llega a la conclusión de que el β -mercaptoetanol puede ser empleado para cuantificar de manera indirecta el conector MPS, debido a que los grupos $-SH$, que es por donde ocurre la reacción con β -mercaptoetanol son estables (no forman puentes disulfuros rápidamente) hasta al menos 48 horas y la reacción de β -mercaptoetanol con el MPS demora aproximadamente 3 horas.

Capítulo 3: Resultados y Discusión

Posteriormente se llevó a cabo la reacción entre el MPS y el β -mercaptoetanol en diferentes relaciones molares y se realizó el ensayo de Ellman, según fue descrito en el epígrafe 2.1.2. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XI.

Tabla XI. Cuantificación de la pureza del MPS mediante reacción con β -mercaptoetanol.

V (ml)	ABS promedio	CONC bmerc libre (mM)	mol bmercp libre	mol bmercp inicial	mol bmercp reacc=MPS reacc	mol MPS inicial	MPS reacc/MPS inic (%)
1,01	1,2545	1,1008	$1,11 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$3,88 \cdot 10^{-7}$	$3,90 \cdot 10^{-7}$	99,54
1,02	0,816	0,7148	$7,29 \cdot 10^{-7}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$7,71 \cdot 10^{-7}$	$7,80 \cdot 10^{-7}$	98,83
1,03	0,3795	0,3306	$3,41 \cdot 10^{-7}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$1,16 \cdot 10^{-6}$	$1,17 \cdot 10^{-6}$	99,10
1,039	0,0058	0,0017	$1,78 \cdot 10^{-9}$		$1,50 \cdot 10^{-6}$	$1,52 \cdot 10^{-6}$	98,57
							Promedio 99,01

En todas estas reacciones de β -mercaptoetanol con MPS se cuantificó el exceso de β -mercaptoetanol luego de ocurrida la reacción, empleando para ello el método de Ellman. Luego, teniendo en cuenta los moles de β -mercaptoetanol iniciales a reaccionar y los moles de este mismo compuesto en exceso, calculados mediante el ensayo de Ellman, por diferencia se determinaron los moles de β -mercaptoetanol que reaccionan con MPS. Los moles de β -mercaptoetanol que reaccionan coinciden con el número de moles de MPS que reaccionan, teniendo en cuenta que según las condiciones ligeramente ácidas empleadas, la reacción con más probabilidad de ocurrir es el ataque nucleofílico del anión tiolato sobre uno de los carbonos adyacentes al doble enlace del anillo maleico. Una vez que se tienen los moles de MPS que reaccionan con β -mercaptoetanol y teniendo en cuenta los moles de MPS iniciales empleados en cada reacción, se puede determinar el porcentaje de MPS que reacciona. Al analizar los resultados mostrados en la tabla XI se puede concluir que aproximadamente el 99% del conector MPS reacciona con el β -mercaptoetanol.

3.3 Cuantificación de P0 en forma de monómero

Para la cuantificación de P0 se procedió como fue descrito en el epígrafe 2.1.3, los resultados obtenidos se muestran en la tabla XII.

Capítulo 3: Resultados y Discusión

Tabla XII. Resultados obtenidos al aplicar el ensayo de Ellman para la cuantificación de P0

Conc real P0 (mM)	abs	conc según ensayo Ellman (mM)
1,5	0,777	0,675
1,5	0,778	0,674
1,5	0,780	0,683
		Promedio 0,678±0,0049

En la tabla XII se puede observar que el péptido P0 de concentración 1,5 mmol/L al aplicarle el ensayo de Ellman, los resultados que se obtienen no están en correspondencia con esta concentración a la que fue preparado. Como el reactivo de Ellman reacciona con los grupos -SH libres, estos resultados infieren que no todos los grupos -SH presentes en este péptido están libres, sino que se encuentran formando puentes disulfuros. Los grupos -SH libres se oxidan con facilidad con infinidad de oxidantes, ejemplo de ello puede ser el oxígeno disuelto en el agua con que se prepara el buffer en el cual se encuentra disuelto este péptido. Según los resultados mostrados en la tabla XII y teniendo en cuenta la conclusión planteada anteriormente aproximadamente solo el 45 % del péptido P0 está en forma de monómero. Se decidió por tanto desoxigenar el agua que se utiliza para preparar el buffer en el cual se disuelve el péptido para evitar de esta forma la rápida dimerización de este péptido y comprobar así si estos puentes disulfuros presentes en el péptido P0 se formaron inmediatamente por la oxidación con el oxígeno disuelto en el agua o si son puentes disulfuros que se originaron durante el proceso de síntesis de este péptido y se encuentran de forma nativa en él.

Luego de desoxigenar el agua para la preparación del buffer fosfato de sodio de pH=6,5 en el cual se disuelve el péptido P0, se realizó el ensayo de Ellman para este péptido, tal y como se había llevado a cabo anteriormente, Los resultados obtenidos al realizar el ensayo de Ellman para el péptido P0 disuelto en buffer fosfato de sodio preparado empleando agua desoxigenada, se muestran en la tabla XIII.

Capítulo 3: Resultados y Discusión

Tabla XIII. Resultados obtenidos al aplicar el ensayo de Ellman para la cuantificación de P0 en buffer fosfato desoxigenado.

Conc real P0 (mM)	abs	conc según ensayo Ellman (mM)
1,5	0,780	0,683
1,5	0,778	0,681
1,5	0,779	0,682
		Promedio 0,682±0,001

Se realizó un análisis estadísticos para la comparación de los valores de concentración de P0 en forma de monómero en buffer fosfato desoxigenado y sin desoxigenar (tablas XII y tabla XIII) mediante la prueba t-Student. Los resultados obtenidos evidencian que no existe diferencias significativas entre la concentración obtenida para el péptido P0, cuando este ha sido disuelto en un buffer desoxigenado y en un buffer sin desoxigenar con un nivel de confianza del 95% ($P=0,1836$) (anexo 2). De este resultado obtenido se deriva que solo el 45% del péptido P0 se encuentra en forma de monómero. Teniendo en cuenta que el ensayo de Ellman se lleva a cabo inmediatamente que se prepara la disolución de P0, esto conduce a inferir que el péptido P0 posee puentes disulfuros nativos en él, que pueden haberse generado durante su proceso de síntesis, lo cual coincide con resultados similares obtenidos para otros péptidos reportados por Andreu y colaboradores (Andreu et al., 1994).

3.4 Evaluación de la formación de puentes disulfuros en el péptido P0 en el tiempo

Se evaluó la formación de puentes disulfuros en el péptido P0 en buffer fosfato de sodio desoxigenado y sin desoxigenar tal y como fue descrito en el epígrafe 2.1.4. Los resultados obtenidos cuando el péptido P0 fue disuelto en buffer fosfato sin desoxigenar y desoxigenado se muestran en la tabla XIV.

Tabla XIV. Concentración de monómeros de péptido P0 en diferentes tiempos y condiciones de oxidación.

Tiempo (h)	Conc P0 en buffer sin desoxigenar (mM)	Conc P0 en buffer fosfato desoxigenado (mM)
0	0,680	0,680
1	0,659	0,680
2	0,584	0,679

Capítulo 3: Resultados y Discusión

3	0,572	0,677
6	0,440	0,599

Con los datos mostrados en la tabla XIV se realizaron dos gráficos de concentración vs tiempo para el péptido disuelto en buffer sin desoxigenar y en buffer desoxigenado respectivamente. Los resultados obtenidos se observan en la figura 11.

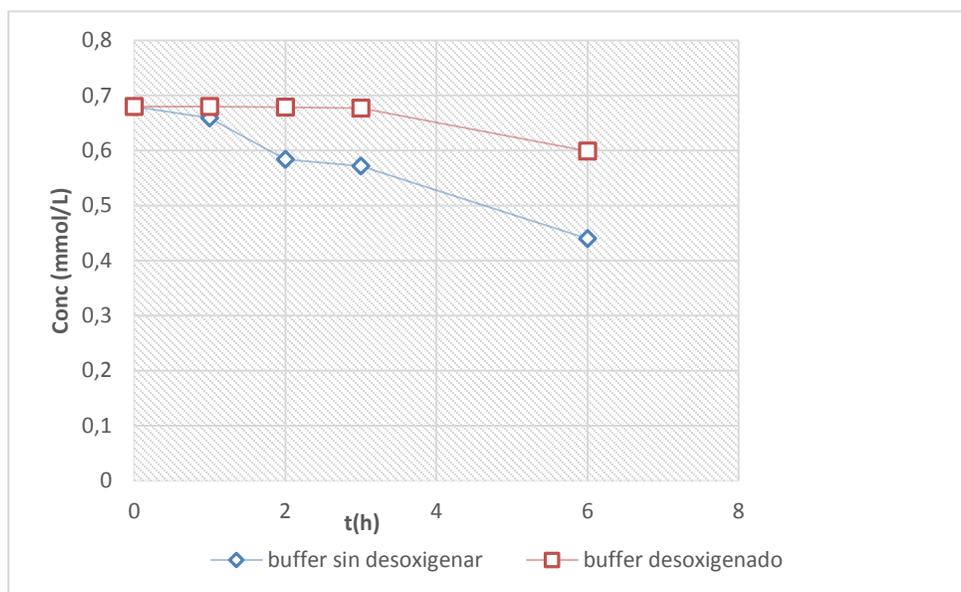


Figura 11. Variación de la concentración del péptido P0 disuelto en buffer sin desoxigenar y en buffer desoxigenado en función del tiempo.

En la figura 11 se observa que cuando el péptido P0 se disuelve en un buffer que ha sido previamente desoxigenado con una corriente de nitrógeno gaseoso, la velocidad de dimerización es menor, pues hasta las 2 primeras horas no hay diferencias significativas en la concentración obtenida al aplicar el ensayo de Ellman, mediante el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de confianza del 95% (anexo 3). A diferencia, cuando el péptido P0 ha sido disuelto en un buffer que no ha recibido ningún tratamiento previo (sin desoxigenar) a la hora de encontrarse el péptido en solución, a temperatura ambiente, ya hay diferencias significativas en la concentración de P0 en forma de monómero (anexo 4). Este resultado infiere que el oxígeno disuelto en el agua está contribuyendo a la oxidación de los grupos -SH libres del péptido P0 que se encuentra en forma de monómero. En conclusión, el péptido P0 debe ser disuelto en un buffer

Capítulo 3: Resultados y Discusión

desoxigenado para permitir que la mayor cantidad de grupos sulfhidrilos permanezcan sin formar puentes, pues son estos grupos los que participan en la reacción con el grupo maleimido del conector MPS, permitiendo por tanto su conjugación a la proteína BM86. No obstante a ello, el proceso de dimerización aunque es poco apreciable a las tres horas en el buffer fosfato desoxigenado, si está ocurriendo igualmente este proceso. Con el propósito de predecir con mayor precisión cual es la concentración de P0 en forma de monómero en el tiempo para cualquier concentración inicial de P0, se realizó un estudio del proceso de dimerización del péptido P0.

Para determinar el orden de la reacción de dimerización del péptido P0 disuelto en buffer desoxigenado y la ecuación de la recta que mejor describe el comportamiento de la concentración de P0 en el tiempo se calcularon los parámetros:

$$\text{conc P0}/\text{conc P0}_{\text{inic}}, \ln (\text{conc P0}/\text{conc P0}_{\text{inic}}), 1/(\text{conc P0}/\text{conc P0}_{\text{inic}}), 1/(\text{conc P0}/\text{conc P0}_{\text{inic}})^2.$$

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XV.

Tabla XV. Parámetros calculados para determinar el orden de la reacción de la dimerización del péptido P0 en buffer fosfato desoxigenado.

tiempo(h)	Conc (P0/P0 _{inic}) (mM)	ln (conc P0/conc P0 _{inic})	1/(concP0/concP0 _{inic})	1/(concP0/concP0 _{inic}) ²
0	1	0	1	1
1	0,999138	-0,00086	1,000863	1,001727
2	0,998275	-0,00173	1,001728	1,003458
3	0,995257	-0,00475	1,004765	1,009554
6	0,880611	-0,12714	1,135576	1,289532

Se realizaron gráficos de $\text{conc P0}/\text{conc P0}_{\text{inic}}$ vs tiempo, $\ln (\text{conc P0}/\text{conc P0}_{\text{inic}})$ vs tiempo, $1/(\text{conc P0}/\text{conc P0}_{\text{inic}})$ vs tiempo, $1/(\text{conc P0}/\text{conc P0}_{\text{inic}})^2$ vs tiempo y se determinó la ecuación de la recta que describe cada uno de estos gráficos, así como el coeficiente de determinación. De todos estos gráficos el que mayor R² presente determinará si la reacción

Capítulo 3: Resultados y Discusión

es de primer orden, segundo orden o tercer orden, respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 13.

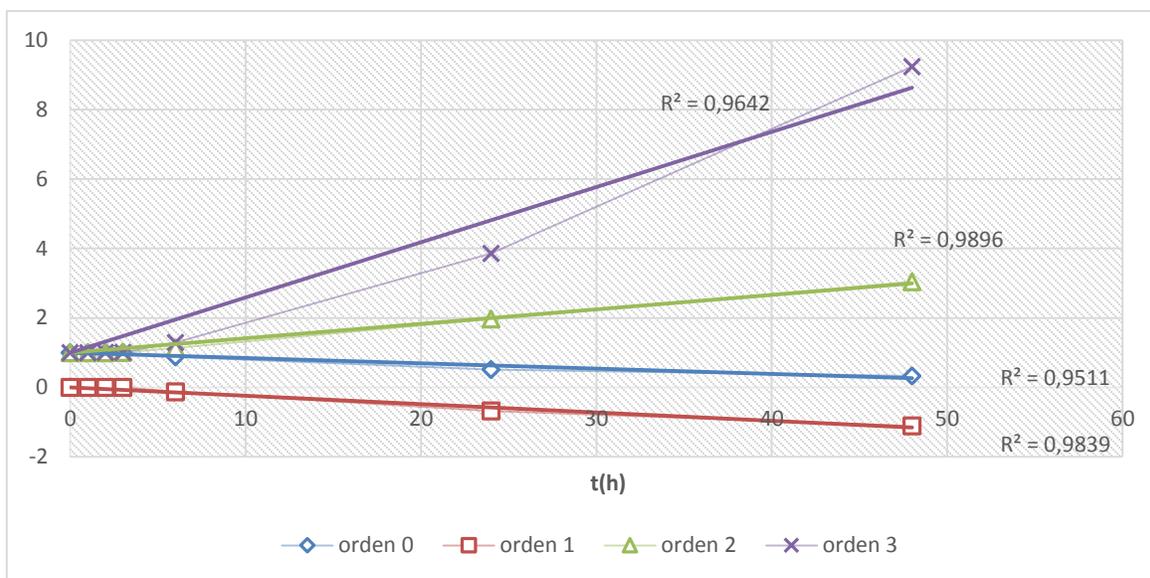


Figura 12. Gráficos obtenidos a partir de la tabla XV para determinar el orden de la reacción de dimerización del péptido P0 en buffer desoxigenado.

Según lo mostrado en la figura 12, el gráfico que presenta mayor valor del coeficiente de determinación (0,9896) corresponde al de segundo orden. Esto implica que la reacción de dimerización del péptido P0 es de segundo orden y específicamente refleja el caso $2M \rightarrow D$, es decir dos moles de péptido P0 se unen formando un puente disulfúrico para dar lugar a un mol de dímero de P0, este resultado coincide con lo reportado por Sauer (Sauer, 2005). La ecuación de la recta que describe este gráfico es $c = 0,0416t + 1$ donde $c = 1/(\text{conc P0}/\text{conc P0}_{\text{inic}})$, esta ecuación es empleada para determinar la cantidad de P0 que permanece en forma de monómero cuando este se encuentra en solución durante el proceso de conjugación a la proteína BM86. Según el protocolo empleado para la conjugación del péptido P0 a la proteína BM86 (documento no publicable) el tiempo necesario para la reacción entre el grupo maleimido y el grupo -SH del péptido P0 es de 3 horas. Al sustituir este valor en la expresión de la recta, obtenemos que el porcentaje de péptido que permanece en forma de monómero transcurrido este tiempo es el 40%.

3.5 Conjugación del péptido P0 a la proteína BM86 (primera etapa)

3.5.1 Determinación de los moles de MPS que reaccionan por cada mol de BM86

Los resultados obtenidos al aplicar el ensayo de Ellman a la reacción entre el β -mercaptoetanol y el MPS en exceso resultante de la reacción con la proteína BM86, tal y como fue descrito en el epígrafe 2.1.5.2 se muestran en la tabla XVI para el caso de la proteína BM86 (1).

Tabla XVI. Cuantificación del MPS en exceso de la reacción con BM86 (1).

V total (mL)	ABS PROM	CONC bmerc LIBRE (mmol/L)	mol bmerc libre	mol bmercp inicial	mol bmercp reacc = mol MPS reacc	Promedio mol MPS reacc (exceso en la conjugación)
1,143	1,3935	1,2202	$1,3972 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$1,05341 \cdot 10^{-7}$	
1,143	1,3895	1,2167	$1,3982 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$1,09355 \cdot 10^{-7}$	$1,0735 \cdot 10^{-7}$
1,143	1,3915	1,2184	$1,3972 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$1,07348 \cdot 10^{-7}$	

El valor promedio de moles de MPS que reaccionan con β -mercaptoetanol mostrado en la tabla XVI ($1,0735 \cdot 10^{-7}$) constituye aproximadamente los moles de MPS en exceso resultantes de la reacción con la proteína BM86 (1) en el volumen analizado. Entonces si en 143 μ L de mezcla de reacción entre la proteína BM86 y MPS hay $1,07350 \cdot 10^{-7}$ moles de MPS en exceso, en la mezcla de reacción total (5350 μ L) hay $4,0162 \cdot 10^{-6}$ moles de MPS en exceso. Teniendo en cuenta que se añadieron en la reacción 350 μ L de MPS de una solución de concentración 0,039 mol/L y que este conector según lo demostrado anteriormente posee un 99% de sus moléculas activas, los moles de MPS iniciales a reaccionar con BM86 son $1,351 \cdot 10^{-5}$ moles. Finalmente por diferencia entre el número de moles de MPS iniciales y el número de moles de MPS en exceso se puede determinar que aproximadamente $9,49 \cdot 10^{-6}$ moles de MPS reaccionaron con la proteína BM86 (1). Si tenemos en cuenta que de la proteína BM86 de concentración 3,5mg/mL se emplearon en la reacción con el MPS 5mL y con su masa molar 86000g/mol, tenemos que en la reacción

Capítulo 3: Resultados y Discusión

hay $2,035 \cdot 10^{-7}$ moles de BM86. Determinando la razón entre los moles de MPS que reaccionan con la proteína y los moles de proteína añadida se obtiene que por cada mol de BM86 (1) reaccionan 46,65 moles de MPS es decir aproximadamente 47 moles. Este resultado lleva a inferir que de los 55 grupos NH_2 (54 lisinas más el extremo -N terminal) presentes en la proteína BM86 aproximadamente 47 de ellos se encuentran expuestos, lo que puede deberse a la estructura terciaria y cuaternaria que adopta esta proteína. Todos los resultados anteriormente discutidos quedaron resumidos en el anexo 5.

Los resultados obtenidos en la cuantificación del exceso de MPS en la reacción con la proteína BM86 (2) se muestran en la tabla XVIII.

Tabla XVIII. Resultados de la cuantificación del MPS en exceso en la reacción con BM86 (2).

V total (mL)	ABS promedio	CONC bmerc libre (mmol/L)	mol bmerc libre	mol bmercp inicial	mol bmercp reacc = mol MPS reacc	Promedio mol MPS reacciona
1,143	1,3695	1,1991	$1,3706 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$1,2942 \cdot 10^{-7}$	
1,143	1,369	1,1987	$1,3701 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$1,2993 \cdot 10^{-7}$	$1,2942 \cdot 10^{-7}$
1,143	1,37	1,1995	$1,3711 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$1,2892 \cdot 10^{-7}$	

En este caso el número de moles de MPS que reaccionan con β -mercaptoetanol que a la vez son el número de moles de MPS en exceso de la conjugación con la proteína BM86 (2) es $1,2942 \cdot 10^{-7}$ moles. Procediendo con los cálculos igual que se analizó para la proteína BM86 (2) se obtiene que el número de moles de MPS en exceso en toda la mezcla de reacción ($5427 \mu\text{L}$) es $4,9116 \cdot 10^{-6}$ moles. Como en este caso la cantidad de MPS que se añadió a la reacción con la proteína BM86 fue $427 \mu\text{L}$ y teniendo en cuenta que el 99% de las moléculas de MPS se encuentran activas, entonces los moles de MPS iniciales a reaccionar son aproximadamente $1,648 \cdot 10^{-5}$ moles. Por diferencia entre el número de moles iniciales de MPS y la cantidad de este en exceso en la reacción con la proteína BM86, se determinó que $1,1568 \cdot 10^{-5}$ moles de MPS reaccionan con la proteína BM86 (2). El número de moles de BM86 presentes en la mezcla de reacción se determinaron de igual forma que para el caso de BM86 (1), teniendo en cuenta que esta vez la concentración de BM86 es $4,15 \text{ mg/ml}$ y el valor obtenido fue de $2,41 \cdot 10^{-7}$ moles. De esta forma se obtiene que para la

Capítulo 3: Resultados y Discusión

proteína BM86 (2) por cada mol de esta proteína reaccionan 48,00 moles de MPS, indicando por tanto que en este caso el número de lisinas que esta proteína tiene expuestas es de aproximadamente 48. Todos los resultados anteriormente discutidos quedaron resumidos en el anexo 6. Los resultados obtenidos en el caso de la proteína BM86 (3) para la cuantificación del MPS en exceso se muestran en la tabla XX.

Tabla XX. Resultados de la cuantificación del MPS en exceso en la reacción con BM86 (3).

V total (mL)	ABS PROM	CONC bmerc LIBRE	mol bmerc libre	mol bmercp inicial	mol bmercp reacc = mol MPS reacc	Promedio mol MPS reacc
1,143	1,381	1,2092	$1,3821 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$1,1788 \cdot 10^{-7}$	
1,143	1,382	1,2101	$1,3831 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$1,1688 \cdot 10^{-8}$	$1,1755 \cdot 10^{-7}$
1,143	1,381	1,2092	$1,3821 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$1,1788 \cdot 10^{-7}$	

Los resultados obtenidos en la tabla XX reflejan que $1,1755 \cdot 10^{-7}$ moles de MPS estaban en exceso en el volumen analizado. Luego teniendo en cuenta el volumen total de la mezcla de reacción (5350 μ L), entonces el número de moles totales de MPS en exceso en la reacción con la proteína BM86 (3) son $4,398 \cdot 10^{-6}$ moles. La cantidad de sustancia inicial de MPS a reaccionar con BM86 coincide con el valor ($1,351 \cdot 10^{-5}$ moles) obtenido para la proteína BM86 (1), pues el volumen empleado de la solución de MPS es el mismo. Por diferencia entre los moles iniciales y los moles en exceso de MPS se obtuvo que $9,112 \cdot 10^{-6}$ moles de MPS reaccionan con la proteína BM86 (3). Los moles de BM86 empleados en este caso en la reacción con el conector MPS es $1,94 \cdot 10^{-7}$ moles. La razón entre el número de moles de MPS que reaccionan con la proteína y el número de moles de BM86 (3) es 46,96, lo que indica que aproximadamente por cada mol de proteína BM86 (3) reaccionan 47 moles de MPS. El resultado obtenido refleja que para la proteína BM86 (3) solo 7 de sus 54 lisinas no se encuentran por alguna razón, probablemente debido a su estructura globular, disponible para reaccionar con el conector MPS. Todos los resultados anteriormente discutidos quedaron resumidos en el anexo 7.

3.5.2 Comprobación mediante HPLC por exclusión molecular de la separación del MPS en exceso

Con el propósito de separar todo el MPS en exceso y preparar por tanto así la mezcla para la conjugación del péptido P0, una vez que se filtró la mezcla de reacción BM86-MPS restante, se analizó por HPLC por exclusión molecular, para comprobar de forma cualitativa la separación. Primeramente fue analizada por HPLC por exclusión molecular la proteína BM86 antes de la reacción con MPS, los resultados obtenidos se muestran en la figura 15.

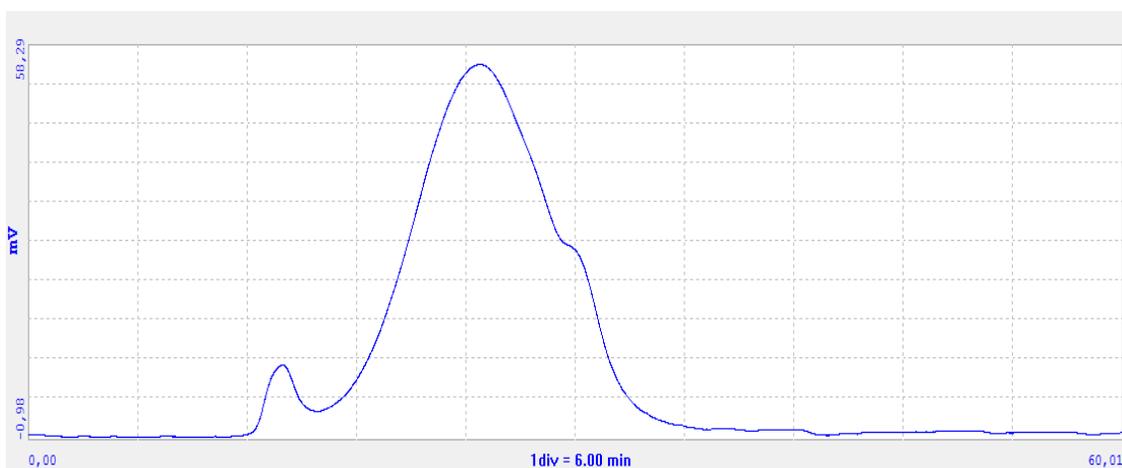


Figura 15. Cromatograma obtenido por HPLC por exclusión molecular de la proteína BM86.

En la figura 15 se observa que la proteína BM86 muestra dos picos, el primero presenta un tiempo de retención 10,38 min y el segundo 24,56min. De este resultado se infiere que hay una pequeña parte de esta proteína que se encuentra formando unidades estructurales de mayores tamaño que el resto, lo que posibilita que eluya más rápidamente. A partir de los resultados encontrados con la elución de esta proteína se puede establecer que cualquier pico que aparezca a tiempos posteriores al tiempo de elución del segundo pico correspondiente a la proteína BM86, puede ser un indicio de que durante la separación del MPS en exceso de la reacción con BM86, no todo fue eliminado.

Con el propósito de establecer esta comparación, una vez que se realizó la reacción entre la proteína BM86 (1), BM86 (2), BM86 (3) y el conector MPS y que se procedió a la eliminación del exceso de este, se analizó por HPLC por exclusión molecular de la muestra

Capítulo 3: Resultados y Discusión

resultante. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 16, figura 17 y figura 18, respectivamente.

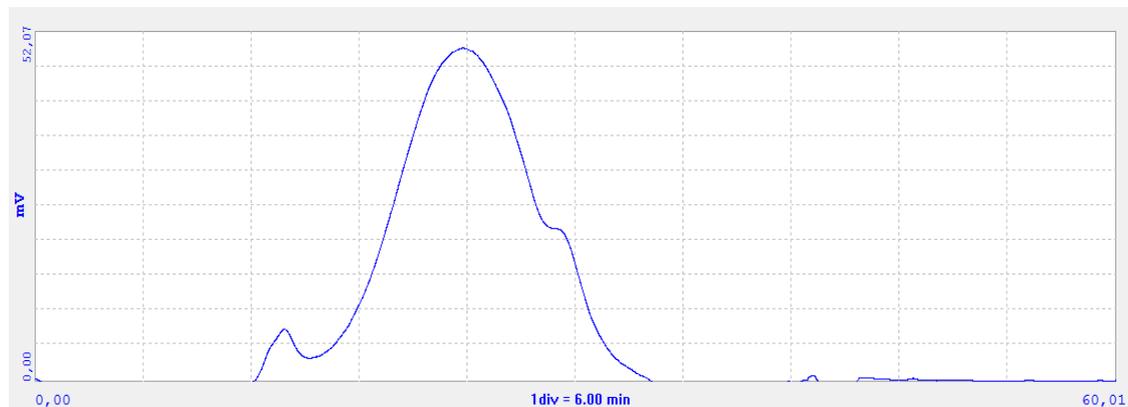


Figura 17. Cromatograma BM86 (1)-MPS filtrada para eliminar el MPS en exceso

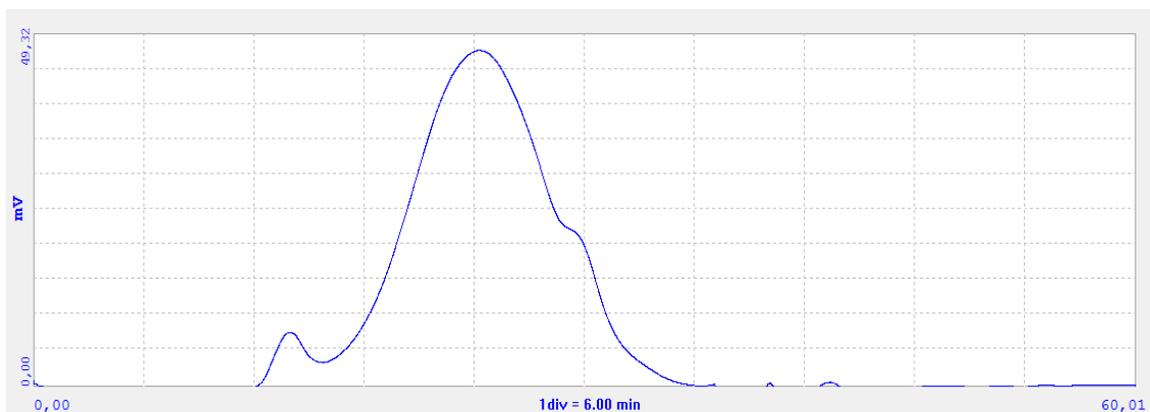


Figura 16. Cromatograma BM86 (2)-MPS filtrada para eliminar el MPS en exceso

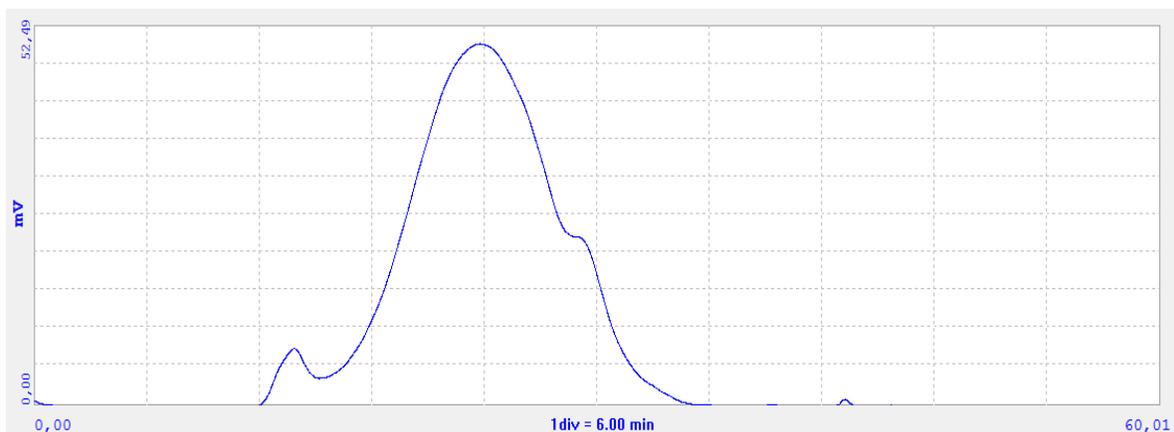


Figura 18. Cromatograma BM86 (3)-MPS filtrada para eliminar el MPS en exceso

Como se observa en las figuras 16, 17, 18 el comportamiento obtenido en la separación del MPS en exceso mediante la columna PD-10 Desalting Columns, luego de realizada la reacción entre el conector y la proteína BM86 son muy semejantes para BM86 (1), BM86 (2), BM86 (3). Los cromatogramas obtenidos en los tres casos reflejan que no quedó cantidad apreciables de MPS en exceso sin eliminar, pues considerando el menor tamaño molecular el MPS (266,21g/mol) este debe eluir a un tiempo mucho menor que la proteína BM86 de mucho mayor tamaño (86000g/mol). Este resultado obtenido indica por tanto que la mezcla de reacción BM86-MPS está en condiciones para realizarse la conjugación con el péptido P0.

3.6 Conjugación del péptido P0 a la proteína BM86 (segunda etapa)

Una vez que se llevó a cabo la reacción de conjugación del péptido P0 durante tres horas a temperatura ambiente y se realizó el ensayo de Ellman al exceso de péptido separado mediante filtración, se obtuvieron los resultados mostrados en la tablas XXII, XXIII y XXIV, para las proteínas BM86 (1), BM86 (2), BM86 (3), respectivamente.

Tabla XXII. Cuantificación del exceso de P0 de la conjugación a la proteína BM86 (1).

Abs promedio (P0)	conc(mmol/L)
0,1105	0,0938
0,1120	0,0952
0,1110	0,0943
	Promedio 0,0944

Los resultados mostrados en la tabla XXII evidencian que la concentración de P0 en exceso resultante de la conjugación a la proteína BM86 es de 0,0944mmol/L, lo que implica que en el volumen de reacción $1,7 \cdot 10^{-3}$ L la cantidad de P0 en exceso es $1,6048 \cdot 10^{-7}$ moles. Teniendo en cuenta que el volumen de P0 (concentración 5mmol/L) que se empleó en la conjugación fue 700 μ L los moles teóricos de P0 en la conjugación deben ser $3,5 \cdot 10^{-6}$ mol,

Capítulo 3: Resultados y Discusión

pero al transcurrir las tres horas de reacción según la ecuación cinética para la reacción de dimerización que experimenta el péptido P0 en tampón fosfato desoxigenado obtenida en el epígrafe 3.4 solo el 40% del péptido se encuentra en forma de monómero. Los moles totales de P0 en forma de monómero al transcurrir las tres horas son por tanto $1,4 \cdot 10^{-6}$ moles. Por diferencia entre el número de moles totales de P0 en forma de monómeros a reaccionar y el número de moles de P0 en exceso se obtiene que $1,24 \cdot 10^{-6}$ moles de P0 reaccionan con la proteína BM86 (1). Para determinar los moles de BM86 que se encuentran en reacción con los 700 μ L de P0 fue necesario tener en cuenta la dilución que sufre la mezcla BM86-MPS cuando se eluyó por la columna PD-10 Desalting Columns (factor de dilución 1,4), de esta manera se determina que los moles de BM86 que se encuentran en la mezcla de reacción son $2,716 \cdot 10^{-8}$ moles. La razón existente entre los moles de P0 que reaccionan con el conector MPS unido a la proteína y los moles de proteína añadida es 45,58 lo que equivale a decir que por cada mol de BM86 (1) reaccionan aproximadamente 46 moles de P0. Este resultado obtenido demuestra que no todas las moléculas de P0 en forma de monómero lograron unirse a las moléculas de MPS que con anterioridad se habían unido a la proteína BM86. Que no se hayan unido todas las moléculas de P0 que moléculas de MPS conjugadas, puede deberse a que el grupo maleimido del conector MPS puede sufrir un proceso de hidrólisis, que provoca la formación del ácido maleico, compuesto que no es reactivo a los grupos SH libres. Los resultados discutidos anteriormente quedan resumidos en el anexo 8.

Tabla XXIV. Cuantificación del exceso de P0 de la conjugación a la proteína BM86 (2).

abs promedio	Conc P0 monomérico (mM)
0,0105	0,0061
0,0101	0,0057
0,0102	0,0058
	Promedio 0,0058

Capítulo 3: Resultados y Discusión

Según los resultados mostrados en la tabla XXIV la concentración de P0 en exceso es 0,0058 mmol/L, por tanto en los $1,7 \cdot 10^{-3}$ L de mezcla de reacción hay en exceso $9,86 \cdot 10^{-9}$ moles de P0. Como en todas las conjugaciones el volumen de P0 empleado fue el mismo y teniendo en cuenta que a las 3 horas solo un 40% de P0 se encuentra en forma de monómero, la cantidad de sustancia de P0 inicial a reaccionar continua siendo $1,4 \cdot 10^{-6}$ moles. Por diferencia se determinó entre los moles iniciales y los moles en exceso de P0 que el número de moles de P0 que reaccionan es $1,39 \cdot 10^{-6}$ moles. El número de moles de BM86 presentes en la mezcla se determinó siguiendo el mismo procedimiento descrito para el caso de BM86 (1) solo teniendo en cuenta que la concentración de BM86 en este caso es 4,15 mg/mL y el valor obtenido fue de $3,175 \cdot 10^{-8}$ moles. La razón entre el número de moles de P0 que reaccionan y los moles de BM86 presentes es de 43,78 es decir que aproximadamente 44 moles de P0 reaccionan por cada mol de BM86. Según estos resultados para el caso de BM86 (2) tan poco hay plena concordancia entre el número de moléculas de MPS unidas a la proteína BM86 y el número de moléculas de P0 conjugadas. Esto puede deberse al igual que para BM86 (1) por el proceso de hidrólisis que sufre el grupo maleimido del conector MPS. Los resultados discutidos anteriormente quedan resumidos en el anexo 9.

Tabla XXV. Cuantificación del exceso de P0 de la conjugación a la proteína BM86 (3).

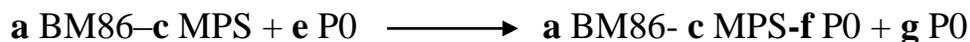
abs promedio	conc(mmol/L)
0,1655	0,1421
0,1665	0,1430
0,1655	0,1421
	Promedio 0,1424

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en la tabla XXVI y siguiendo el mismo procedimiento descrito para BM86 (1) y BM86 (2) se determinó que la cantidad de P0 en forma de monómero que logran conjugarse a la proteína BM86 (3) es $1,16 \cdot 10^{-6}$ moles. La concentración de la proteína BM86 (3) empleada en la conjugación es 3,34mg/ml y

realizando el mismo procedimiento que se ha ido siguiendo en la cuantificación de los moles de BM86 en los dos casos anteriores, se determinó que el número de moles de BM86 (3) es $2.592 \cdot 10^{-8}$ moles. Al calcular la razón entre el número de moles de P0 que se conjugan y el número de moles de BM86 presentes en la mezcla se obtiene 44,67 es decir aproximadamente 45 moles de P0 se conjugan por cada mol de BM86 (3). Al igual que para los dos casos anteriores el número de moléculas de P0 (45 moles) que se conjugan no resulta ser el valor esperado según el número de moléculas de MPS (47 moles) conjugadas. Los resultados discutidos anteriormente quedan resumidos en el anexo 10.

3.7 Establecimiento de la relación molar BM86-MPS-P0

Esquemáticamente la reacción de conjugación de P0 con BM86, en sus dos etapas se puede representar de la siguiente forma:



dónde: **a:** Moles de BM86 reaccionantes

b: Moles de MPS reaccionantes

c: Moles de MPS que reaccionan con **a** moles de BM86

d: Moles de MPS en exceso

e: Moles de P0 reaccionantes

f: Moles de P0 que reaccionan con **a** moles de BM86

g: Moles de P0 en exceso

La relación c/a equivale al número de moléculas de MPS que se unen a una molécula de BM86 y la relación f/a equivale al número de moléculas de P0 que se conjugan a una molécula de BM86. Estas dos relaciones son las que permiten establecer la estequiometría de la reacción de conjugación de P0 a BM86, de forma tal que de aquí en lo adelante las cantidades de MPS y P0 que se utilicen en la conjugación respondan a esta relación y no se generen por tanto excesos de estos reactivos. Un promedio de los resultados obtenidos para

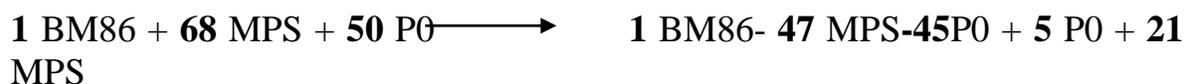
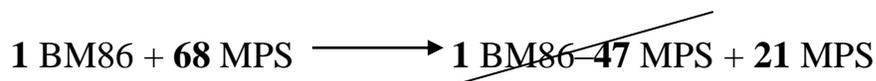
Capítulo 3: Resultados y Discusión

BM86 (1), BM86 (2) y BM86 (3) en el epígrafe 3.7 permite establecer la relación estequiométrica BM86-MPS-P0 (tabla XXVII).

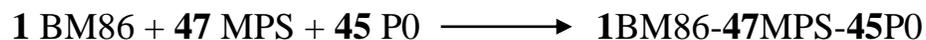
Tabla XXVII. Establecimiento de la relación estequiométrica BM86-MPS-P0

Proteína	moles MPS reacc/mol	moles P0 conjugados/mol
	BM86 (c/a)	BM86 (f/a)
BM86 (1)	47	46
BM86 (2)	48	44
BM86 (3)	47	45
	Promedio	Promedio
	47	45

Sustituyendo los moles de los reactivos empleados en la conjugación de P0 en el esquema mostrado al inicio del epígrafe se obtiene:



Es decir la relación estequiométrica de la reacción de conjugación del péptido P0 a la proteína BM86 es:



Conclusiones

- Como promedio por cada mol de proteína BM86 se logran conjugar 47 moles de MPS y 45 moles de P0.
- El ensayo de Ellman mostró una capacidad satisfactoria para la cuantificación de grupos –SH libres con un coeficiente de determinación de 0,997.
- El 99% de las moléculas de MPS se encuentran activas y dispuestas para reaccionar.
- Empleando buffer desoxigenado se logra reducir la velocidad de dimerización del péptido P0.
- De los 55 grupos –NH₂ que presenta la proteína BM86 47, se encuentran expuestos para reaccionar con el conector MPS.
- De los 47 grupos maleimido del MPS conjugados a la proteína BM86, 45 se conjugaron al péptido P0.

Recomendaciones

- Reducir los puentes disulfuros presentes en el péptido P0 con algún agente reductor (borohidruro de sodio, DTT o hidruro de litio y aluminio) para lograr ahorrar mayor cantidad de este péptido durante el proceso de conjugación.
- Estudiar la estabilidad del conector MPS en solución.

Revisión Bibliográfica

2007. Aplicación del control integrado de parasites (CIP) a la garrapata *Boophilus microplus* en Uruguay. .
- ANDREU, D., ALBERICIO, F., SOLÉ, N. & FERRER, M. 1994. Formation of disulfide bonds in Synthetic Peptides and Proteins. 35.
- BIOSCIENCES 2014. Protein Cross-Linkers.
- BIOTECHNOLOGY, P. 2004. Ellman's Reagent. USA.
- BIOTECHNOLOGY, P. 2005. BMPS. USA.
- BRAZ, L. C. C., DE FERREIRA, O. & BORGES, M. L. 2011. Seasonal dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs from a police unit in Goiania, Brazil. 37, 464-469.
- CHAMOW S.M., K. P. 2005. Conjugation of soluble CD4 without loss of biological activity via a novel carbohydrate-directed cross-linking reagent". *Biol. Chem.* , 22, 15916-15922.
- DANTAS-TORRES, F. & 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* .
. *Vet Parasitol* , 173–185. .
- DOUGLAS HAYWORTH, P. D. 2015. Química de la reticulación.
- ELLMAN, G. L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem*, 82, 70-72.
- GONG, H. 2008. *VET PARASITOL*. 151, 268-278.
- GONZALEZ, S., ALVAREZ, A., CABALLERO, E. & VINA, L. 2010. P64k meningococcal protein as immunological carrier for weak immunogens. *Scand J Immunol*, 113-116.
- GONZALEZ, Y. 2012. *Composición vacunal para el control de las infestaciones por ectoparásitos*. Cuba patent application PCT/CU2011/000005.
- GRAY, J., DANTAS-TORRES, F., ESTADA-PEÑA, A. & LEVINE, M. 2013. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. . *Ticks and Tick-borne Diseases* 4, 171-180.
- HANES J., C. J. L., LANGER R. 2002. New advances in microsphere-based single-dose vaccines. *Advanced drug delivery reviews*, 97-119.
- HANSEN, R. & WINTER, J. 2007. Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4,4'-dithiodipyridine. *Analytical Biochemistry*.
- HERMANSON, G. 2008. *Bioconjugate Techniques*, USA.
- IZQUIERDO, C. 2012. *Importancia de la garrapata Rhipicephalus snguineus como vector de enfermedades infecciosas en la clínica de perros y en la salud pública.*, Universidad Veracruzana.
- JONSSON, N., MATSCHOSS, A., PEPPER, P., GREEN, P., ALBRECHT, M., MHUNGERFORD, J. & ANSELL, J. 2000. Evaluation of TickGARDPLUS , a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein–Friesian cows. *Veterinary Parasitology*. 88, 275-285.
- LÉON, M. 2012. Descripción de la proteína Bm86, polimorfismo y su papel como inmunógeno en el ganado bovino infestado por garrapatas. *Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10.
- LORENZANA, C. 2005. Infestación por garrapatas en el perro. *Virvac Salud animal*. México.
- MALLON, A. R. 2013. *Efecto de un péptido de la proteína ribosomal PO como inmunógeno contra garrapatas del género Rhipicephalus (Acari: Ixodidae)*. Doctor en Ciencias Biológicas.
- MANZANO, R., DÍAZ, V. & PÉREZ, R. 2013. Daños producidos por las garrapatas y métodos de control del parásito.
- NIJHOF, A., BALK, J., POSTIGO, M., RHEBERGEN, A., TAOUFIK, A. & JONGEJAN, F. 2010. Bm86 homologues and novel ATAQ proteins with multiple epidermal grow factor (EGF)- like domains from hard and soft ticks. . *Int. J. Parasitol*.

- OPDEBEECK, J., WONG, J., JACKSON, L. & DOBSON, C. Vaccines to protect Hereford cattle against the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Immunology*, 363-367.
- PAROLA, P. & RAOULT, D. 2001 Tick and Tickborne bacterial diseases in humans: An emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases* 32, 897-928
- PÉREZ, H. E. G. 2012. Doctor en Ciencias Químicas.
- PÉREZ, M. T. 2007. *Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV)*. Universidad de Barcelona.
- PIERCE, T. S. 2013. Crosslinking Technical Handbook.
- RAND, K., MOORE, T., SRISKANTHA, A., SPRING, K., TELLAM, R., WILLADSEN, P. & COBON, G. 1990. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*, 9657 – 9661.
- RIDDLES, P. W. 1983. Reassessment of Ellman's reagent. *Meth. Enzymol.*, 91, 49-60.
- RODRÍGUEZ, M., MONTERO, C., MACHADO, H. & JOGLAR, M. 2001. The evaluation of yeast derivatives as adjuvants for the immune response to the Bm86 antigen in cattle. *BCM Biotechnology*.
- ROJAS, E. 2010. Género *Rhipicephalus*. *Infomeria*, 1-5.
- ROMÁN, R., DÍAZ, V. & PÉREZ, R. 2012. GARRAPATAS: CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS, EPIDEMIOLOGICAS Y CICLO VITAL. DETALLES DE LA INFLUENCIA DE LAS GARRAPATAS SOBRE LA PRODUCCIÓN Y SANIDAD ANIMAL *Parasitología Animal*.
- RUBIO, M., CAMACHO, S., VERDUGO, I. & GUAJARDO, S. 2015. *Rhipicephalus sanguineus* en caninos en Sinaloa, México *REDVET - Revista electrónica de Veterinaria*. México.
- S.A 2010. Ingeniería Química. 9.
- SAUER, R., T. 2005. Review of Chemical Kinetics. 1-8.
- SIGMA-ALDRICH, I. 2005. 5,5'-DITHIO-BIS(2-NITROBENZOIC ACID).
- SUÁREZ, M., MÉNDEZ, M., VALDEZ, M., MOURA, R., REIS, J. & VARGAS, N. 2009. Control de las infestaciones de la garrapata *Boophilus microplus* en la ganadería Cubana y en regiones de Latinoamérica con la aplicación del inmunógeno Gavac® dentro de un programa de lucha integral.
- TAM J. P., L. Y. A. 2012. Vaccine engineering: enhancement of immunogenicity of synthetic peptide vaccines related to hepatitis in chemically defined models consisting of T- and B-cell epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 9084-9088.
- TELLAM, R., SMITH, D., KEMP, D. & WILLADSEN, P. 2002. Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology. .
- VEGA, G. B. & LUÉVANO, M. P. 2011. Enfermedades transmitidas por garrapatas. *Guía de zoonosis de Garrapatas*.
- WILLADSEN, P. 2004. Anti-tick vaccines. *Parasitology*, 367-387.
- WOJDA, I. 2002. *Acta Biochar*. 49, 947-957.
- WONG, S. 2000. *Chemistry of protein Conjugation and Cross-Linking*, Houston, Texas.
- WOOD, M., HERNÁNDEZ, N., DELGADO, I., MONTAÑEZ, M. & SÁNCHEZ, J. C. 2014. Validación del método de Ellman para la determinación de la concentración de grupos sulfhidrilos a muestras de la producción de la vacuna sintética contra el *Haemophilus influenzae* tipo b. *VacciMonitor*, 23, 73-80.
- XU, Y., BRUNO, J. & LUFT, J. 2005. Identification of novel tick salivary gland proteins for vaccine development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 901-904.
- ZHANG, H. 2007. *Mol Biochem Parasitol*. 153, 141-148.

Anexos

Anexo1. Comparación estadística entre los valores de concentración de bmercaptoetanol en el tiempo.

Table Analyzed	Data 1			
ANOVA summary				
F	0.04614			
P value	0.9998			
P value summary	ns			
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	No			
R square	0.01979			
Brown-Forsythe test				
F (DFn, DFd)	0.2553 (7, 16)			
P value	0.9628			
P value summary	ns			
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)	No			
Bartlett's test				
Bartlett's statistic (corrected)				
P value				
P value summary				
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)				
ANOVA table	SS	DF	MS	
Treatment (between columns)	$2.016 \cdot 10^{-6}$	7	$2.880 \cdot 10^{-7}$	P value
Residual (within columns)	$9.988 \cdot 10^{-5}$	16	$6.243 \cdot 10^{-6}$	P = 0.9998
Total	0.0001019	23		
Data summary				
Number of treatments (columns)	8			
Number of values (total)	24			

Anexo 2. Comparación estadística entre los valores de concentración de P0 en el buffer sin desoxigenar y en el buffer desoxigenado.

Column A	Data Set-A
Unpaired t test	
P value	0.1836
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1.606 df=4
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	0.6773 ± 0.002848 N=3
Mean ± SEM of column B	0.6820 ± 0.0005774 N=3
Difference between means	0.004667 ± 0.002906
95% confidence interval	-0.003402 to 0.01273
R square	0.3920
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	24.33, 2, 2
P value	0.0789
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No

Anexo 3. Comparación estadística entre los valores de concentración de P0 disuelto en buffer desoxigenado en el tiempo.

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Col_5	3	0.684667	X
Col_4	3	0.773333	X
Col_3	3	0.775667	XX
Col_2	3	0.776333	X
Col_1	3	0.777	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Col_1 - Col_2		0.000666667	0.0024856
Col_1 - Col_3		0.00133333	0.0024856
Col_1 - Col_4	*	0.00366667	0.0024856
Col_1 - Col_5	*	0.0923333	0.0024856
Col_2 - Col_3		0.000666667	0.0024856

Col_2 - Col_4	*	0.003	0.0024856
Col_2 - Col_5	*	0.0916667	0.0024856
Col_3 - Col_4		0.00233333	0.0024856
Col_3 - Col_5	*	0.091	0.0024856
Col_4 - Col_5	*	0.0886667	0.0024856

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Anexo 4. Comparación estadística entre los valores de concentración de P0 disuelto en buffer sin desoxigenar en el tiempo.

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Col_5	3	0.503333	X
Col_4	3	0.654	X
Col_3	3	0.667333	X
Col_2	3	0.752667	X
Col_1	3	0.776333	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Col_1 - Col_2	*	0.0236667	0.0151412
Col_1 - Col_3	*	0.109	0.0151412
Col_1 - Col_4	*	0.122333	0.0151412
Col_1 - Col_5	*	0.273	0.0151412
Col_2 - Col_3	*	0.0853333	0.0151412
Col_2 -	*	0.0986667	0.0151412

Col_4			
Col_2 - Col_5	*	0.249333	0.0151412
Col_3 - Col_4		0.0133333	0.0151412
Col_3 - Col_5	*	0.164	0.0151412
Col_4 - Col_5	*	0.150667	0.0151412

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 9 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Anexo 5: Determinación de la relación molar BM86 (1)/MPS.

Moles MPS en exceso=moles MPS reacc con β -mercaptoetanol (V=143 μ L)	Moles MPS en exceso (V=5350 μ L)	Moles de MPS inicial (V=5350 μ L)	Moles de MPS que reaccionan (V=5350 μ L)	Moles de BM86 iniciales (V=5350 μ L)	Relación molar MPS/BM86 (1)
1,0250*10 ⁻⁷	3,835*10 ⁻⁶	1,351*10 ⁻⁵	9,675*10 ⁻⁶	2,035*10 ⁻⁷	48

Anexo 6: Determinación de la relación molar BM86 (2)/MPS.

Moles MPS en exceso=moles MPS reacc con β -mercaptoetanol (V=143 μ L)	Moles MPS en exceso (V=5427 μ L)	Moles de MPS inicial (V=5427 μ L)	Moles de MPS que reaccionan (V=5427 μ L)	Moles de BM86 iniciales (V=5427 μ L)	Relación molar MPS/BM86 (2)
1,2942*10 ⁻⁷	4,9116*10 ⁻⁶	1,648*10 ⁻⁵	1,1568*10 ⁻⁵	2,41*10 ⁻⁷	48

Anexo 7: Determinación de la relación molar BM86 (3)/MPS.

Moles MPS en exceso=moles MPS reacc con β -mercaptoetanol (V=143 μ L)	Moles MPS en <i>exceso</i> (V=5350 μ L)	Moles de MPS <i>inicial</i> (V=5350 μ L)	Moles de MPS que <i>reaccionan</i> (V=5350 μ L)	Moles de BM86 <i>iniciales</i> (V=5350 μ L)	Relación molar MPS/BM86 (3)
$1,1755 \cdot 10^{-7}$	$4,398 \cdot 10^{-6}$	$1,351 \cdot 10^{-5}$	$9,112 \cdot 10^{-6}$	$1,94 \cdot 10^{-7}$	<u>47</u>

Anexo 8: Determinación de la relación molar P0-BM86 (1).

Conc P0 exceso (mmol/L)	volum P0 (L)	moles P0 exceso (monómero)	moles P0 <i>iniciales</i> (monómero)	moles P0 <i>conjugados</i>	moles BM86 <i>iniciales</i>	moles P0/moles BM86
0,0944	0,0017	$1,6048 \cdot 10^{-7}$	$1,40 \cdot 10^{-6}$	$1,24 \cdot 10^{-6}$	$2,72 \cdot 10^{-8}$	<u>46</u>

Anexo 9: Determinación de la relación molar P0-BM86 (2).

Conc P0 exceso (mM)	volum P0 (L)	moles P0 exceso (monómero)	moles P0 <i>iniciales</i> (monómero)	moles P0 <i>conjugados</i>	moles BM86 <i>iniciales</i>	moles P0/moles BM86
0,0058	0,0017	$9,86 \cdot 10^{-9}$	$1,40 \cdot 10^{-6}$	$1,39 \cdot 10^{-6}$	$3,175 \cdot 10^{-8}$	<u>44</u>

Anexo 10: Determinación de la relación molar P0-BM86 (3).

Conc P0 exceso	volum P0 (L)	moles P0 exceso	moles P0 <i>iniciales</i>	moles P0 <i>conjugados</i>	moles BM86 <i>iniciales</i>	moles P0/moles
----------------	--------------	-----------------	---------------------------	----------------------------	-----------------------------	----------------

Anexos

(mM)	(monómero)	(monómero)				BM86
0,1424	0,0017	$2,4208 \cdot 10^{-7}$	$1,40 \cdot 10^{-6}$	$1,16 \cdot 10^{-6}$	$2,59 \cdot 10^{-8}$	<u>45</u>