

Purificación de lipopolisacáridos de *E. coli* 055:B5 por cromatografía de exclusión molecular

✉ Rolando Perdomo, Vivian Montero

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM)
Ave. 26 No. 1605 Esq. Puentes Grandes, CP 10600,
Plaza, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax: 8335556; E-mail: rolando.perdomo@infomed.sld.cu

RESUMEN

Se han descrito varios métodos para la extracción de endotoxinas o lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gramnegativas; sin embargo, el producto suele estar contaminado con ácidos nucleicos y/o proteínas en una proporción que depende del método de extracción empleado. Para estudios moleculares e inmunológicos, se requiere la purificación adicional del extracto de lipopolisacárido. En este artículo se describe el desarrollo de un método para la purificación de un extracto de LPS, obtenido por el método de Westphal, utilizando cromatografía de exclusión molecular en Sepharosa CL-6B. Se demostró que es necesario el tratamiento de la muestra con ADNasa y ARNasa antes de la cromatografía, para obtener la fracción correspondiente a los LPS libres de ácidos nucleicos. Se evaluaron las propiedades espectrofotométricas del LPS en el ultravioleta lejano y se confirmó que es posible la detección inmediata a 206 nm de las fracciones de interés (LPS y ácidos nucleicos), sin emplear métodos químicos más engorrosos. Como fase móvil, se empleó el NaCl 0.2 M, el cual no absorbe a 206 nm y conserva los agregados micelares de los LPS. Ello contribuye a la separación entre la fracción lipopolisacáridica y los oligonucleótidos. Con este procedimiento se obtuvo un LPS con aproximadamente 98% de pureza. Se realizaron controles químicos y biológicos para la evaluación del proceso.

Palabras claves: endotoxinas, lipopolisacáridos, purificación, cromatografía

Biotecnología Aplicada 2006;23:117-123

ABSTRACT

A simple method for purification of lipopolysaccharides from *E. coli* 055:B5 using size exclusion chromatography. Several methods for the extraction of endotoxin or lipopolysaccharide from Gram negative bacteria have been described. However, the product is often contaminated with nucleic acids or proteins in a proportion depending on the extraction method used. Molecular and immunological studies require further purification of the raw LPS. We present here, a simple method for the purification of raw LPS obtained by the standard hot phenol-water procedure using size exclusion chromatography in Sepharose CL-6B. We demonstrated that the using of DNase and RNase treatment of the sample before the chromatographic step is necessary to abrogate the nucleic acid contamination in the LPS fraction. The spectrophotometric properties of the pure LPS were verified, supporting the immediate online detection of the LPS and oligonucleotides fractions spectrophotometrically at 206 nm. The mobile phase used (NaCl 0.2 M) do not absorb at 206 nm while maintains the LPS aggregates and therefore, allows the separation of the LPS fraction from the oligoribonucleotide and desoxyoligoribonucleotide fractions. The yield of pure LPS was around 98%. Chemical and biological characterizations were conducted in order to assess the feasibility of the procedure developed.

Key words: endotoxin, lipopolysaccharide, purification, chromatography

Introducción

Las endotoxinas o lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gramnegativas se pueden obtener por los métodos del ácido tricloroacético a 4 °C [1], butanol acuoso [2], tritón/Mg²⁺ [3], etanol en frío [4] o por extracción con agua a 100 °C [5]. Específicamente para LPS rugosos (LPS-R), se han descrito los procedimientos de extracción con fenol: cloroformo, éter de petróleo [6] y con metanol [7]. El método de extracción de LPS más empleado es el de Westphal [8], también conocido como procedimiento de extracción con fenol caliente. Su principal ventaja radica en el alto rendimiento de LPS que se obtiene, el cual es libre de proteínas contaminantes [2, 8].

Para la eliminación de estos contaminantes, se ha planteado el empleo de la ultracentrifugación [8-10]; sin embargo, el lipopolisacárido sedimentado usualmente contiene determinada cantidad de ácidos nucleicos, y la fracción del sobrenadante perteneciente

a los ácidos nucleicos, contiene cantidades apreciables de lipopolisacáridos que se pierden [8].

La cromatografía de exclusión molecular parece ser la mejor elección para la purificación de LPS-R o lipooligosacáridos (LOS). Se ha descrito un aumento en el rendimiento de más del 50%, en la purificación por exclusión molecular de LOS de *N. meningitidis*, *H. influenzae* y *B. pertussis* con respecto a la ultracentrifugación [11], incluso se han empleado métodos por FPLC para la purificación de LOS de *N. meningitidis* [12].

También se ha descrito la purificación de LPS lisos (LPS-S) provenientes de cepas lisas, o sea, que contienen la cadena lateral O específica completa, con el empleo de la cromatografía de exclusión molecular [2]. Sin embargo, la principal desventaja que se ha apreciado en estos métodos cromatográficos, en general, aplicados a LPS-S y a LPS-R, es al detectar

1. Staub AM. Bacterial lipido-proteinopolysaccharides ("O" somatic antigens). Extraction with trichloroacetic acid. In Whistler RL, Wolan ML editors. *Methods in Carbohydrate chemistry*. New York: Academic Press Inc, 1965(5):92-3.

2. Morrison DC, Leive L. Fractions of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111:B4 prepared by two extraction procedures. *J Biol Chem* 1975;250(8):2911-9.

3. Delahooke DM, Barclay GR, Poxton IR. A reappraisal of the biological activity of bacteroides LPS. *J Med Microbiol* 1995; 42(2):102-12.

4. Sonesson A, Jantzen E, Bryn K, Larsson L, and Eng J. Chemical Composition of Lipopolysaccharide from *Legionella pneumophila*. *Arch Microbiol* 1989;153:72-8.

las posiciones de los picos de LPS, para lo cual se han usado métodos químicos, tales como la determinación de colitosa (3.6 didesoxi-L-galactosa) [2], ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico (KDO) [11] y hexosas totales [13]. Estos métodos son trabajosos y consumen tiempo, por lo que en este trabajo se incluye una valoración de las propiedades espectroscópicas de los LPS en el ultravioleta (UV) lejano, con el objetivo de emplear la detección directa e inmediata a 206 nm de las fracciones relevantes.

Por otra parte, el tratamiento previo de la muestra con nucleasas, parece ser una opción viable para mejorar la separación entre los LPS y los ácidos nucleicos. Esto se ha empleado tanto en ultracentrifugación [14] como en los métodos cromatográficos [11-12]. El ácido ribonucleico (ARN) es el principal contaminante (entre 50 y 60%) del extracto obtenido por el método de Westphal [8], por lo que hay protocolos que incluyen un paso para remover el ARN mediante el empleo de RNasa [2, 10, 12] o de cetavlon (bromuro de cetiltrimetilamonio) [8]. Sin embargo, también se han descrito procedimientos en los que se emplea DNasa y RNasa para favorecer la separación del ADN y ARN, respectivamente, antes del paso de purificación del extracto [11, 13, 15]. Es por esto que otro de los objetivos del presente trabajo, es definir si es necesario el empleo de nucleasas para obtener la fracción cromatográfica perteneciente a los LPS libres de ácidos nucleicos y, de ser así, evaluar si es suficiente el tratamiento de la muestra con RNasa, o si se requiere la hidrólisis con ambas nucleasas para obtener un LPS de mayor grado de pureza.

Por tanto, este artículo describe un procedimiento que incluye la cromatografía de exclusión molecular para la purificación del extracto de LPS crudo (LPSc), obtenido por el método de Westphal a partir de la cepa *E. coli* O55:B5.

Materiales y métodos

Extracción de LPS

La extracción de LPS se realizó por el método de Westphal y Jann [8] con ligeras modificaciones. La suspensión de bacterias (5% en base seca en 100 mL), se mezcló con igual volumen de fenol al 90% previamente calentado a 67 °C, y se incubó a la misma temperatura con agitación orbital a 160 rpm durante 15 min en un baño termostatao. Posteriormente, la mezcla se colocó en un baño de hielo para favorecer la separación de fases, y se centrifugó durante 20 min a 5 000 g. Se colectó la fase acuosa superior. A la mezcla de fenol y debris celular remanente se realizó una segunda extracción mediante la adición de 100 mL de agua destilada a 67 °C. Las fases acuosas se combinaron, se dializaron contra varios cambios de agua destilada hasta la completa eliminación del fenol (ausencia de absorbancia a 260 nm en el agua de diálisis). El dializado se clarificó por centrifugación a 10 000 g durante 20 min a temperatura ambiente para eliminar el material insoluble. Seguidamente, el dializado con el extracto de LPS se concentró por precipitación alcohólica del siguiente modo: se le adicionó acetato de sodio a una concentración final de 0.15 M, se colocó en un baño de hielo y se adicionó etanol frío al 96%, gota a gota, y

con agitación, hasta alcanzar una proporción de volumen, muestra: etanol, de 1:4. La mezcla se almacenó a -20 °C durante 24 horas para permitir la continuación del proceso de precipitación. El precipitado se colectó por centrifugación a 4 000 g, se resuspendió en agua destilada a una concentración de 25 mg/mL en una base húmeda y se liofilizó.

Tratamiento de las muestras con nucleasas antes del proceso cromatográfico

Con la finalidad de evaluar el tratamiento de la muestra con nucleasas en la separación cromatográfica y en el contenido de ácidos nucleicos del producto puro, se estudiaron dos sistemas. En el primero, el extracto de LPS liofilizado se disolvió en NaCl 0.2 M a una concentración de 25 mg/mL en un volumen final de 10 mL, y se incubó a 37 °C durante 1 h con RNasa a una concentración final de 0.5 mg/mL. En el segundo, se empleó RNasa y DNasa a una concentración final de 0.5 mg/mL y 50 µg/mL, respectivamente, siguiendo la misma metodología. En ambos casos, la reacción enzimática de hidrólisis se detuvo incubando la mezcla a 65 °C durante 12 min [15]. Como control, se dejó una muestra que se sometió al proceso cromatográfico sin previa digestión con nucleasas.

En todos los casos, antes de ser sujeta al proceso de purificación, la muestra se homogenizó por agitación vigorosa con Vortex durante 5 min, o por sonicación en un baño ultrasónico Branson 1 200, y se microfiltró con filtros de acetato de celulosa de 0.45 µm.

Procedimiento cromatográfico

La purificación del extracto de LPS se llevó a cabo con el empleo de un sistema cromatográfico de baja presión Gradifrac™ (Farmacia). El extracto o LPSc (de 8 a 10 mg/mL en NaCl 0.2 M), se aplicó a una columna XK 16/70 (Farmacia) empacada con Sepharosa CL-6B (Farmacia) previamente equilibrada con NaCl 0.2 M. La separación se llevó a cabo a un flujo de 9 cm h⁻¹ con detección por absorción ultravioleta a 206 nm. Para los análisis se colectaron fracciones de 3 ó 5 mL. Para caracterizar el volumen de elusión de las muestras, se empleó el coeficiente de distribución aparente (K_{av}).

Las fracciones correspondientes al pico de LPS se mezclaron y concentraron por precipitación alcohólica, como se describió anteriormente para el LPSc, pero sin la adición de la sal. El precipitado se resuspendió en agua destilada y se liofilizó.

Análisis químico

Para la identificación de la fracción de LPS, se realizó la detección cualitativa de ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico (KDO), por el micrométodo del ácido tiobarbitúrico (TBA), descrito por Karkhanis [16], en las fracciones correspondientes al máximo de cada pico. Donde se indicó la presencia cualitativa de ácidos nucleicos en las fracciones cromatográficas, se determinó mediante el barrido espectrofotométrico de 200 a 300 nm.

El contenido de ácidos nucleicos en el extracto de LPS y en los LPS obtenidos de los procesos cromatográficos, se estimó asumiendo que 40 µg/mL de ARN tienen una absorbancia de 1.0 a 260 nm [12]. El contenido de proteínas contaminantes se determinó por el método de Bradford, con el empleo de albúmina

5. Eidhin DN, Mounon C. A rapid method for preparation of rough and smooth lipopolysaccharide from bacteroides, Porphyromonas and Prevotella. FEMS Microbiol Lett 1993;110(2):133-8.

6. Galanos C, Luderitz O, Westphal O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharide. Eur J Biochem 1969;9(2):245-9.

7. Nurminen M, Vaara M. Methanol extracts LPS from deep rough bacteria. Biochem Biophys Res Commun 1996; 219(2):441-2.

8. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. In: Whistler RL, Wolfrom ML, editors. Methods in Carbohydrate chemistry. New York: Academic Press Inc.; 1965(5):83-91.

9. Hancock I, Poxton I. Separation and purification of surface components. In Hancock I, Poxton I, editors. Bacterial Cell Surface Techniques. Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore: John Wiley and Sons 1988:91.

10. Tanamoto K-I. Induction of prostaglandin release from macrophages by bacterial endotoxin. Methods in Enzymology 1994;234:31-41.

11. Wu L, Tsai C-M, Frasch C. A Method for purification of bacterial R-type lipopolysaccharides (lipooligosaccharides). Analytical Biochemistry 1987;160:281-9.

12. Evans JS, Maiden CJ. Purification of meningococcal lipooligosaccharide by FPLC techniques. Microbiology 1996; 142:57-62.

13. Johnson KG, Perry MB. Improved techniques for the preparation of bacterial lipopolysaccharides. Can J Microbiol 1976;22:29-34.

14. Vinogradov E, Cedzynski M, Ziolkowski A, Swierczko A. The structure of the core region of the lipopolysaccharide from *Klebsiella pneumoniae* O3. Eur J Biochem 2001;268:1722-9.

15. Beckmann I, van Eijk HG, Mikolajczyk FM, Wallenburg HCS. Detection of 2-keto-3-deoxyoctonate in endotoxins isolated from six reference strains of the bacteroides fragilis group. Int J Biochem 1989; 21(6):661-6.

16. Karkhanis Y, Zeltner J, Jackson J and Carlo D. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. Analyt Biochem 1978;85: 596-601.

bovina, como estándar, según el protocolo de Bollag y cols. [17].

Los LPS se compararon químicamente por electroforesis en SDS-PAGE con el empleo de un gel de poliacrilamida al 15% [18]. El gel se reveló por tinción con plata, específica para LPS, mediante el procedimiento descrito por Hancock y Poxton [19].

La potencia del LPS se determinó mediante el ensayo del lisado de amebocitos de *limulus* (LAL), método de gelificación (Biowhitaker Inc.), con una sensibilidad de 0.06 unidades de endotoxinas por mililitro (UE/mL), con el empleo de un protocolo antes estandarizado [20].

Se estudió la relación entre la densidad óptica (DO) y la concentración de los LPS puros en el UV lejano. Para esto, se disolvieron cantidades precisas de LPS puro en NaCl 0.2 M a concentraciones entre 1 µg/mL y 2 mg/mL. Las soluciones se leyeron en un espectrofotómetro Genesys 2PC contra NaCl 0.2 M como blanco.

Resultados

El rendimiento de LPS en el extracto fue del 8%, con respecto a la biomasa bacteriana seca. Este presentó una potencia de 4.8 unidades de endotoxinas (UE/ng) por el ensayo del LAL. Esta potencia es similar a la descrita para extractos de LPS provenientes de la misma cepa [21]. Presentó un contenido de 44% de ácidos nucleicos (tabla 1).

Los resultados de la detección cualitativa de KDO en los que se obtuvo una absorbancia de 0.246 UA y 0.003 UA para los picos uno y dos, respectivamente, sugieren que los LPS eluyen principalmente en el primer pico cromatográfico, mientras que los ácidos nucleicos lo hacen, sobre todo, en el segundo. En la figura 1 se puede apreciar que la resolución no es óptima cuando se aplica directamente el extracto de LPS (LPS_c) al proceso cromatográfico. Se obtuvieron Kav correspondientes a la fracción de LPS y ácidos nucleicos de 0 y 0.57, respectivamente. El barrido espectrofotométrico de una muestra correspondiente a la fracción lipopolisacáridica (Figura 2), presenta un máximo de adsorción a una longitud de onda de 260 nm, lo cual sugiere que aún presenta ácidos nucleicos contaminantes.

En la figura 3 se presenta el perfil cromatográfico de la muestra tratada previamente con RNasa. Se obtiene un incremento en la resolución, con valores de Kav de 0 y 0.84 para las fracciones uno y dos, respectivamente; sin embargo, desde el punto de vista cualitativo aún se aprecia ácido nucleico contaminante, presumiblemente ADN (DO máxima 260 nm = 0.253 UA).

Tabla 1. Control de ácidos nucleicos y proteínas en los liofilizados de extracto de LPS (A), LPS obtenido por el procedimiento cromatográfico sin tratamiento previo con nucleasas (B) y el LPS purificado al que se aplicó hidrólisis previa con RNasa y DNasa antes del proceso cromatográfico (C)

	A	B	C
Ácidos nucleicos	44 ± 0.5292%	12 ± 0.3605%	1.75 ± 0.3258%
Proteínas	<1%	< 1%	< 1%

La solución de LPS se preparó en triplicado para la determinación de ácidos nucleicos y proteínas. Se muestran los valores de la desviación estándar

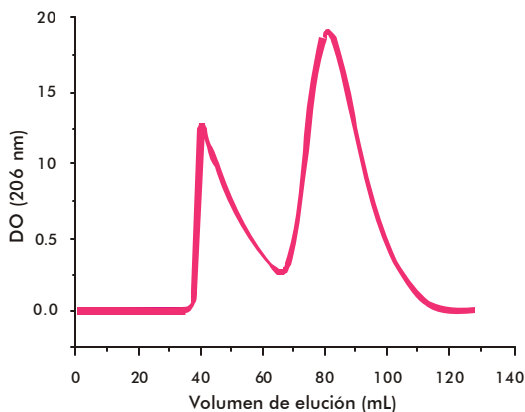


Figura 1. Perfil cromatográfico de la muestra de LPS crudo aplicada sin tratamiento con nucleasas (control) directamente al proceso cromatográfico. Flujo de 9 cm h⁻¹, volumen de inyección 2 mL de extracto de LPS a 5 mg/mL.

Cuando se aplica la hidrólisis de los ácidos nucleicos con DNasa y RNasa antes del proceso cromatográfico, desaparece el máximo en la región de 260 nm del espectro en la fracción lipopolisacáridica (Figura 4), lo cual indica la reducción drástica en el contenido de ácidos nucleicos contaminantes. En estas condiciones, los LPS presentan un máximo de absorción alrededor de los 204 nm y no presentan absorción en la región de 260 a 280 nm, en la que se encuentran los máximos de absorción de los ácidos nucleicos y las proteínas, respectivamente. Se puede apreciar la diferencia entre el perfil del barrido de la fracción lipopolisacáridica y la de los oligonucleótidos. Se obtiene una resolución similar a cuando se emplea solo RNasa antes de purificar la muestra, con valores de Kav de 0 y 0.87 para las dos señales. En la tabla 1 se resume el contenido de ácidos nucleicos y proteínas obtenido en las distintas etapas de purificación.

Los análisis electroforéticos (Figura 5) muestran que se conserva el mismo patrón de bandas entre el LPS crudo y el puro. La potencia del LPS purificado determinada por el método del LAL fue de 48.4 UE/ng.

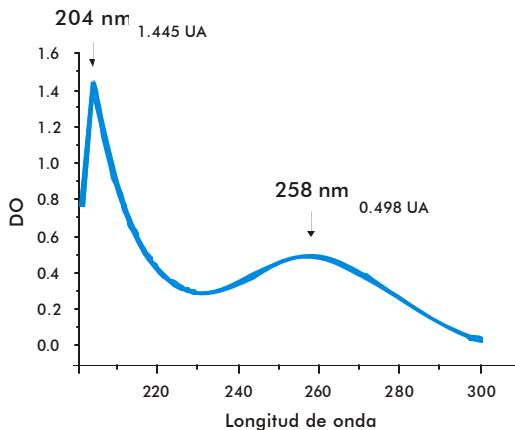


Figura 2. Barrido espectrofotométrico de 200 a 300 nm de la combinación de las fracciones correspondientes a la fracción lipopolisacáridica, obtenida en el proceso cromatográfico cuando se inyecta la muestra de extracto de LPS, en el cual no se ha aplicado hidrólisis con nucleasas.

17. Bollag DM, Rozycki MD, Eldestein SJ. Protein concentration determination. In Bollag MD, Edelstein SD, editors. *Proteins Methods*. New York: Willey-Liss 1996: 45-69.

18. Bollag DM, Rozycki MD, Eldestein SJ. Gel electrophoresis under denaturing conditions. In Bollag MD, Edelstein SD, editors. *Proteins Methods*. New York: Willey-Liss 1996:95-142.

19. Hancock I, Poxton I. Apendix 1. General Methods. In Hancock I, Poxton I, editors. *Bacterial Cell Surface Techniques*. Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore: John Willey and Sons 1988: 269-81.

20. Perdomo R, Montero V. Estandarización del ensayo del Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL) método de gelificación. *Rev Cub Farm* 2004;38(1):1-6

21. Hochstein HD, Mills DF, Outschoorn AS, Rastogi SC. The processing and collaborative assay of a reference endotoxin. *J Biol Stand* 1983;11(4):251-60.

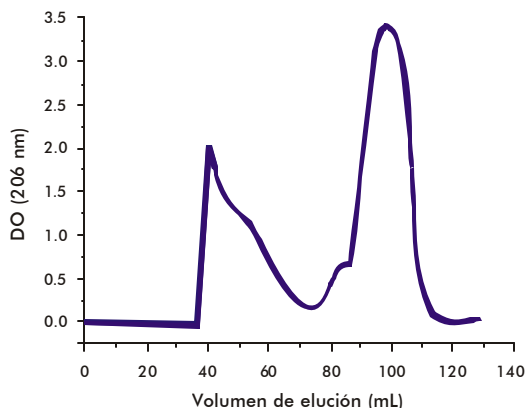


Figura 3. Perfil cromatográfico de la muestra en la que se realizó hidrólisis con RNasa antes del proceso cromatográfico. Volumen de inyección de 2 mL a 8 mg/mL, flujo 9 cm h⁻¹.

Con el tratamiento de ultrasonido o vortex no se observó un efecto desagregante en los LPS. Sin embargo, la aplicación de uno u otro es necesario para la homogenización de la muestra, además de que facilita su microfiltración (por 0.45 o 0.2 μm) antes de ser sometida al proceso cromatográfico. La hidrólisis de la muestra (a 25 mg/mL) con nucleasas reduce significativamente su viscosidad.

La relación entre la absorbancia y la concentración de LPS puros tiene un comportamiento lineal ($R^2 \geq 0.99$) a 206 nm para concentraciones entre 1 μg/mL y 1 mg/mL (Figura 6). A mayores concentraciones de LPS, la DO continúa incrementándose, pero se va perdiendo la linealidad a medida que va aumentando la concentración. A 200 nm se obtiene un comportamiento lineal entre 1 μg/mL y 0.5mg/mL (Figura 6).

Discusión

Mientras que las preparaciones de LPS crudos son adecuadas para los análisis electroforéticos, requieren purificación adicional antes de ser empleados en estudios moleculares e inmunológicos [12].

Aunque es posible separar las fracciones predominantes correspondientes a LPS y ácidos nucleicos, cuando las muestras se someten directamente al proceso cromatográfico, aún se aprecian ácidos nucleicos contaminantes (12%) en el LPS obtenido. El ARN es el principal contaminante del extracto de LPS que se obtiene por el método de Westphal [8]; sin embargo, la hidrólisis con RNasa de la muestra no elimina todo el ácido nucleico contaminante, si bien se observa un incremento de la resolución. Por lo tanto, aunque el ARN puede ser el contaminante mayoritario, también se requiere aplicar digestión de los ácidos nucleicos con ADNsa. Empleando el tratamiento de la muestra con ambas nucleasas antes de la separación cromatográfica, se obtiene un LPS con aproximadamente 98% de pureza.

La hidrólisis de los polímeros de ácidos nucleicos a oligorribonucleótidos y oligodesoxirribonucleótidos, coopera, con la fase móvil en incrementar la resolución, como se explica más adelante, mientras que permite la disminución de la viscosidad de la muestra. Este es uno de los aspectos que limita la concentración de la muestra que se ha de purificar por cromatografía de exclusión molecular.

La elección de la fase móvil debe tenerse en cuenta en el momento de establecer un método cromatográfico para la purificación de cualquier macromolécula. En algunos estudios se describe el empleo de detergentes (desoxicolato de sodio) y EDTA en la fase móvil para separar LPS por métodos cromatográficos [11-12]. La combinación de estos compuestos ejerce un fuerte efecto desagregante, que puede llegar a producir monómeros de LPS con una masa molecular relativa de aproximadamente 20 kDa [22], lo cual origina mayores volúmenes de elución para la fracción correspondiente a los LPS. Este efecto podría ser la causa de las observaciones descritas por Wu y cols. [11], en las que la aplicación de hidrólisis con DNasa del extracto antes de ser sometido a la separación cromatográfica, aumenta la contaminación con proteínas del LOS probablemente por superposición de los lipooligosacáridos con la DNasa. Para lograr purificar los LPS, hubo que eliminar la DNasa antes

22. Weary M and Pearson III F. Manufacturer's guide to depyrogenation. Biopharm 1988:22-9.

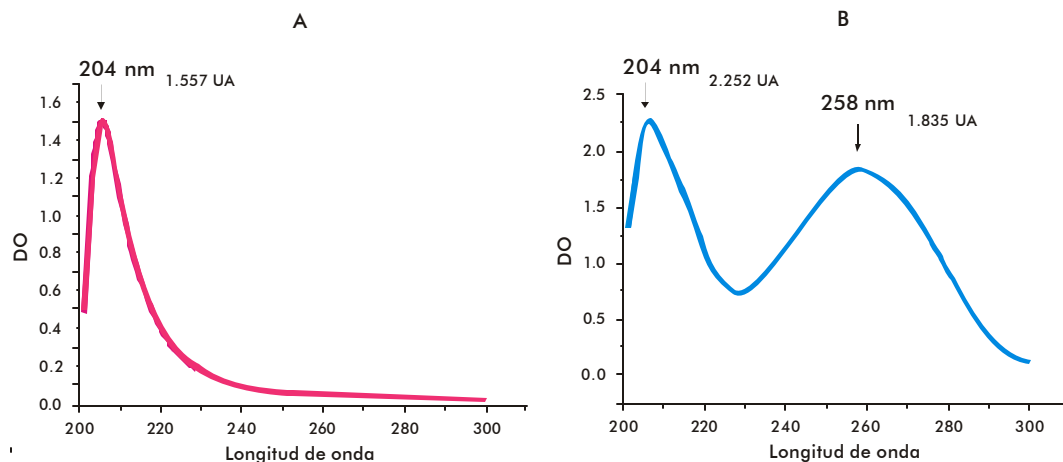


Figura 4. Barrido espectrofotométrico de 200 a 300 nm de las fracciones obtenidas en el proceso cromatográfico cuando se aplicó hidrólisis en la muestra con ARNsa y ADNsa antes del proceso cromatográfico. A) Fracciones cromatográficas correspondientes al primer pico (LPS). B) Segundo pico (oligonucleótidos).

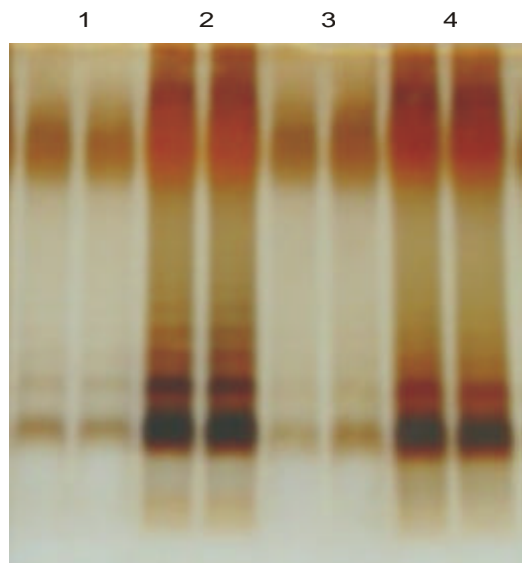


Figura 5. Electroforesis en SDS-PAGE con gel de poliacrilamida al 15%. Carril 1: 5 mg/pocillo del LPS crudo; carril 2: 50 mg/pocillo LPS crudo; carril 3: 5 mg/pocillo de LPS puro; carril 4: 50 µg/pocillo de LPS puro. Cada muestra aparece duplicada.

de la marcha cromatográfica [11], lo cual resta simplicidad al proceso. Sin embargo, la utilización de fases móviles con efectos desagregantes en el LPS, podría ser útil cuando se intenta separar distintas subpoblaciones de LPS [23-25]. Empleando este acercamiento, se han obtenido dos subpoblaciones de LPS de la cepa *E. coli* 055:B5 por cromatografía de exclusión molecular [26].

Por otra parte, los LPS existen como agregados micelares con masa molecular relativa mayor a los 1 000 kDa en soluciones acuosas [22]. Considerando lo antes expuesto y en dependencia de los objetivos propuestos, se podría seleccionar una fase móvil que tenga o no efectos sobre el estado de agregación de los LPS. Como el objetivo de este estudio es la purificación de los LPS de los ácidos nucleicos, y por las ventajas que se discutirán posteriormente, se decidió seleccionar una fase móvil que no afecte el estado de agregación de los LPS en un medio acuoso. En principio, podría tratarse de cualquier disolvente acuoso que no presente detergentes ni agentes quelantes.

Aunque no se comparan con otras fases móviles, el NaCl 0.2 M se seleccionó de manera consciente, pues es un disolvente muy simple que no absorbe en la longitud de onda empleada en el estudio, mientras que

proporciona la fuerza iónica suficiente para evitar artefactos que podrían existir por interacciones no específicas entre la muestra y la fase estacionaria.

Como se había previsto, el NaCl 0.2 M no afectó el estado de agregación de los LPS y estos eluyeron en una fracción única, lo cual proporcionó las siguientes ventajas: 1) El tratamiento con RNasa y DNasa no resulta desventajoso en cuanto a posibilidad de superposición con la fracción lipopolisacáridica, ya que los LPS eluyen en el volumen muerto de la columna ($K_{av} = 0$) y se separan de las nucleasas empleadas; 2) la elución de los LPS en el volumen muerto minimiza los efectos de dilución de la muestra inherentes a la cromatografía de exclusión molecular; y 3) contribuye a la separación del LPS de la fracción de oligonucleótidos producidos por el tratamiento con las nucleasas, y reduce la probabilidad de presencia de polisacáridos capsulares contaminantes.

Los análisis electroforéticos (figura 5) revelan que se conserva el mismo patrón de bandas entre el LPS crudo y el puro. Esto significa que el LPS no se afectó químicamente durante el proceso de purificación, y se mantuvo el mismo conjunto de subpoblaciones que existía antes de ser purificado. Se obtuvo una potencia de 48.4 UE/ng para el LPS purificado, o un incremento de aproximadamente 10 veces con respecto a la potencia del control (LPS crudo), lo cual indica que el método de purificación tampoco afectó la potencia biológica del LPS. Este aumento de potencia se debe a que al aumentar el grado de pureza del producto, hay más LPS por unidad de masa (UE/ng).

Se prefirió seleccionar la detección en el UV lejano, ya que a estas longitudes de onda absorben la mayoría de las moléculas. Esta absorción está dada por las transiciones electrónicas de los orbitales $n-\pi^*$ y $n-s^*$ derivada fundamentalmente de los grupos funcionales carbonilo, carboxilo, amino e hidroxilo [27].

Seid y Sadoff [28] describieron que existe una equivalencia entre la señal de KDO y la absorbancia a 210 nm para la fracción del LPS obtenida por cromatografía. Se podría establecer que esa investigación es el primer antecedente para la detección de LPS en el UV lejano. Recientemente, se presentó un método para la caracterización de subpoblaciones de LPS de la cepa *E. coli* 055:B5 por electroforesis capilar de alta resolución, empleando la detección a 200 nm de las diferentes subpoblaciones de LPS [29].

Este estudio demuestra que en el UV lejano (tanto a 200 como a 206 nm) se obtiene una relación lineal entre la concentración de LPS puro y la densidad óptica para determinado rango de concentraciones (Figura

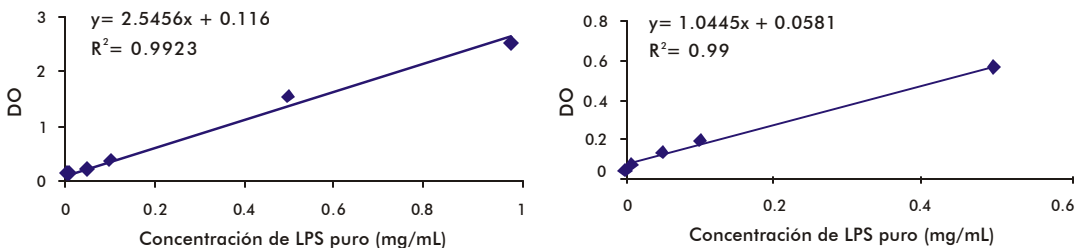


Figura 6. Gráfico de linealidad de concentración de LPS frente a la DO. Panel de la izquierda: 206 nm. Panel de la derecha: 200 nm.

23. Rivera M, Bryan LE, Hancock REW, McGroarty EJ. Heterogeneity of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of lipopolysaccharide chain length. *J Bacteriol* 1988;170(2):512-21.

24. Lam MYC, McGroarty EJ, Kropinski AM, McDonald LA, Perdersen SS, Hoiby N, Lam JS. Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1989; 27(5):962-7.

25. Hatano K, Goldberg JB, Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: evidence that the O side chains and common antigens are on the same molecule. *J Bacteriol* 1993;175 (16):5117-28.

26. Peterson AA, McGroarty EJ. High-molecular-weight components in lipopolysaccharides of salmonella typhimurium, *Salmonella minnesota*, and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1985;162 (2):738-45.

27. Rao CN. Espectroscopia de absorción en el ultravioleta lejano. In Rao CN editors. *Espectroscopia ultravioleta y visible*. Madrid-Barcelona-Buenos Aires-México: Alhambra 1970:175-88.

28. Seid RC, Sadoff JC. Preparation and characterization of detoxified lipopolysaccharide-protein conjugates. *J Biol Chem* 1981;256(14):7305-10.

29. Volpi N. Separation of *Escherichia coli* 055:B5 lipopolysaccharide and detoxified lipopolysaccharide by high-performance capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2003;24:3097-103.

6), por lo que se cumple la ley de Lambert-Beer, y se está ante una señal analítica.

Los LPS son moléculas anfifílicas, compuestas por una región lipídica, unida covalentemente por un enlace éster a una porción polisacárida. Esta última está compuesta por la cadena lateral O específica y por el centro oligosacárido, en cuya estructura presenta el ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico (KDO), mediante el cual se une la porción lipídica. El componente lipídico está constituido por un disacárido de glucosamina, que posee de cuatro a seis cadenas de ácidos grasos, unidos por enlaces éster y amida [30].

La detección en el UV lejano se ha utilizado ampliamente en el análisis y purificación de ácidos grasos por cromatografía (para ejemplo ver [31]). La molécula de lípido A está en todos los LPS. Es la porción más conservada de la molécula entre cepas de un mismo microorganismo, e incluso entre especies distintas de bacterias gramnegativas [30], por lo que es de esperarse que todos los LPS presenten determinada absorbancia a estas longitudes de onda. Por otra parte, se ha descrito que en LPS a los cuales se les han eliminado los ácidos grasos esterificados [28], en LPS detoxificados (libres de lípido A) [29], e incluso en polisacáridos bacterianos [32], hay absorción en el UV lejano. Ello sugiere que tanto la porción polisacárida como los ácidos grasos del lípido A, contribuyen a la absorción de los LPS a longitudes de onda cercanas a los 200 nm.

El método desarrollado se empleó para la purificación de extractos obtenidos por el método de Westphal a partir de una cepa salvaje de *Escherichia coli* (EC01) y otra de *Enterobacter agglomerans* (EA01) (para el cromatograma ver figura 7). Los LPS eluyen en la primera fracción bien resuelto de las nucleasas y los oligonucleótidos. En ambos casos, también se obtuvo un LPS con aproximadamente 98% de pureza.

Cuando el liofilizado de LPS puro se disuelve en agua destilada y se realiza un barrido espectrofotométrico en la región ultravioleta (Figura 8), desaparece el máximo a los 204 nm observado en la

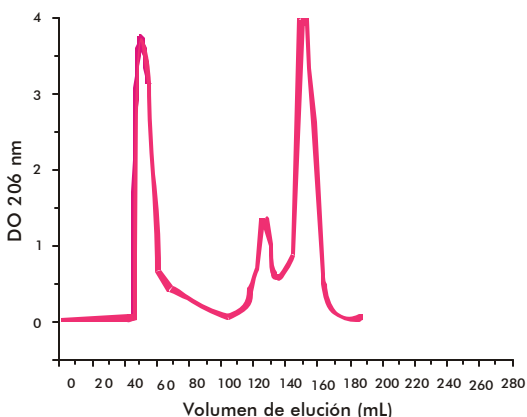


Figura 7. Perfil cromatográfico de LPS crudo de *E. coli* (EC01). El extracto de LPS (11 mL) a 21.2 mg/mL en NaCl 0.2 M, se incubó a 37 °C durante dos horas con RNasa y DNasa a una concentración final de 0.42 mg/mL (8.3 U/mL) y 42 µg/mL (117 U/mL), respectivamente. La reacción de hidrólisis se detuvo a 65 °C durante 12 min. Se inyectaron 5 mL de muestra de LPS a 7 mg/mL. La corrida cromatográfica se realizó en una columna XK 26/70 a un flujo de 9 cm h⁻¹.

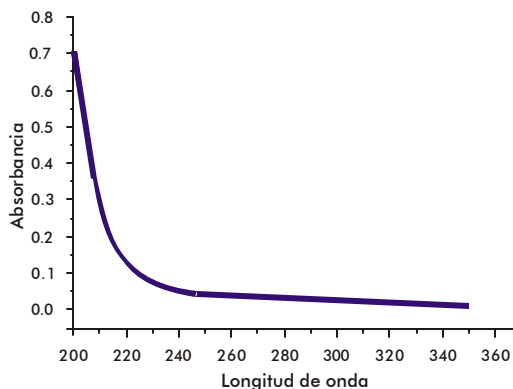


Figura 8. Espectro de absorción del liofilizado de LPS *E. coli* 055:B5 a 0.1 mg/mL puro, disuelto en agua destilada.

fracción cromatográfica de LPS puro (Figura 4a). Este efecto también se observó en los LPS puros EA01 y EC01 (Figura 9). Ese comportamiento se debe a que el NaCl 0.2 M provoca un efecto batocrómico (desplazamiento del máximo de absorción hacia mayores longitudes de onda) en el máximo de absorción de los LPS en el UV lejano. Ello podría significar una ventaja adicional e inesperada del empleo de NaCl 0.2 M como tampón de corrida, ya que incrementaría la sensibilidad de la detección en la longitud de onda usada en el estudio; pero este aspecto requiere de futuras investigaciones. Entre los objetivos del presente trabajo no se encuentra la detección específica y/o sensible de LPS, sino la

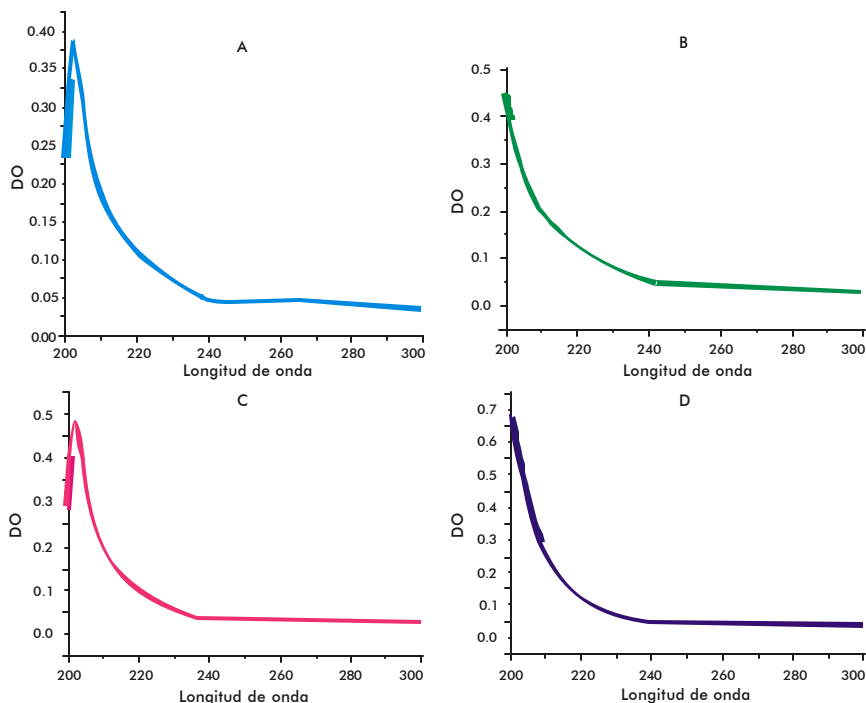


Figura 9. Barridos espectrofotométricos de 200 a 300 nm de LPS puro liofilizado. A) LPS EA01 0.1 mg/mL en NaCl 0.2 M. B) LPS EA01 a 0.1 mg/mL en agua destilada. C) LPS EC01 a 0.1 mg/mL disuelto en NaCl 0.2 M. D) LPS EC01 a 0.1 mg/mL disuelto en agua destilada.

30. Brandenburg K, Wiese A. Endotoxins: relationships between structure, function, and activity. *Curr Topics Med Chem* 2004;4(00):1-20.

31. Lo SK, Baharin BS, Tan CP, Lai OM. Analysis of 1,2(2,3)- and 1,3-positional isomers of diacylglycerols from vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chrom Sci* 2004;42(3):145-54.

32. Pier GB, Sideberry HF, Zolyomi S, Sadoff JC. Isolation and characterization of high-molecular-weight polysaccharide from the slime of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect and Immun* 1978;22(3):908-18.

identificación de las fracciones relevantes durante un proceso de purificación, en el cual se emplea, por lo general, una concentración relativamente alta de la muestra. Para la detección sensible y más específica de LPS se han descrito otros acercamientos (para el ejemplo ver [33-34]), además de bioensayos como el ensayo del lisado de amebocitos de *limulus* (LAL), y la detección de citocinas proinflamatorias por ELISA en sobrenadantes de cultivos celulares, linfocitos aislados o sangre completa.

En la figura 10 se muestra el perfil cromatográfico de la corrida a 206 nm y a 260 nm. La capacidad de absorber en el UV lejano que presentan en los extractos de LPS y los ácidos nucleicos, hace que el sistema de detección empleado para monitorear la corrida cromatográfica resulte apropiado. La identificación por UV de las fracciones cromatográficas obtenidas permite la localización inmediata de los LPS y de los ácidos nucleicos. Los enlaces peptídicos como los restos de aminoácidos aromáticos también absorben en el UV lejano; por tanto, el empleo de estas longitudes de onda permite detectar proteínas contaminantes que usualmente quedan extractos de LPS obtenidos por otros métodos [1-4]. Esto requiere

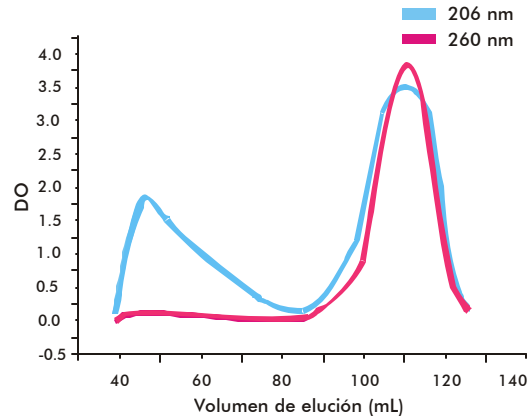


Figura 10. Perfil cromatográfico de la separación del extracto de LPS tratado con ambas nucleasas a 206 y a 260 nm. Flujo 9 cm h⁻¹, volumen de inyección de 2 mL de muestra a 10 mg/mL.

aún futuros estudios para evaluar la factibilidad, para lo cual se requeriría emplear tratamientos de la muestra con proteínas.

33. Lynby J, Olsen LH, Eidem T, Lundanes E, Jantzen E. Quantification of lipopolysaccharides in outer membrane vesicle vaccines against meningococcal disease.

High-performance liquid chromatography determination of the constituent 3-hydroxy-lauric acid. *Biologicals* 2002;30(1): 7-13.

34. Guilford J, Jiang H. Detection of lipopolysaccharide and lipid A employing a spermine-pyrene conjugate. *Bioconjugate Chem* 2005;16:621-5.

Recibido en abril de 2005. Aprobado en febrero de 2006.