

Complejidad y soluciones al problema de aislamiento de las especies moleculares de los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas

✉ Elder Pupo¹, Eugenio Hardy²

¹Laboratorio de Polímeros, Instituto de Ciencia y Tecnología de los Materiales, Universidad de La Habana

²División de Química-Física, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, AP 6162, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: ehardy@imre.oc.uh.cu

REVISIÓN

RESUMEN

Las bacterias Gram negativas sintetizan de manera frecuente un gran número de especies moleculares de lipopolisacáridos (LPS). La elevada heterogeneidad estructural de los LPS y su tendencia a formar agregados moleculares hacen extremadamente difícil el fraccionamiento de sus especies moleculares. La aplicación de métodos cromatográficos de forma individual ha permitido la obtención de fracciones de LPS poco homogéneas. Con la combinación de principios cromatográficos ortogonales, solo se ha logrado la purificación hasta homogeneidad química de los LPS de tipo rugoso más simples. Ello ha determinado que los esfuerzos dirigidos al aislamiento de LPS más homogéneos se centren en el uso de la electroforesis en el gel plano. Los métodos de electroforesis son capaces de separar especies de masas moleculares cercanas de LPS más complejos de tipo liso. Consecuentemente, sobre esta base se ha desarrollado una nueva metodología que permite el aislamiento de LPS intactos de tipo rugoso o liso hasta homogeneidad electroforética. Con ella es posible el análisis estructural sensible por espectrometría de masas y la medición de la actividad LAL (*Limulus Amoebocyte Lysate*) de especies individuales de LPS, compuestas de unas pocas especies químicas. Esta metodología ha abierto las puertas hacia la posibilidad de combinar la electroforesis con otros principios ortogonales de separación, un próximo paso que podría facilitar la obtención de preparaciones químicamente homogéneas a partir de mezclas de LPS complejas.

Palabras clave: lipopolisacárido, aislamiento, cromatografía, electroforesis, tinción inversa, elución, espectrometría de masas

Biotecnología Aplicada 2009;26:1-8

ABSTRACT

Complexity and solutions to the isolation problem of Gram negative lipopolysaccharides' bacteria molecular species. Gram negative bacteria frequently synthesize a great number of lipopolysaccharides (LPS) molecular species, the high LPS structural heterogeneity and its trend to conform molecular aggregates make the functioning of its molecular species extremely difficult. The application of chromatographic methods individually has allowed the obtainment of little homogeneous LPS fractions. With the combination of orthogonal chromatographic principles, only the purification of the simplest rough type LPS up to chemical homogeneity has been reached. This has determined that efforts aimed at more homogeneous LPS isolation is focused on the use of electrophoresis in smooth gel. Electrophoresis methods are capable of separating species of molecular masses next to the most complex smooth type LPS. Consequently upon this basis, a new methodology allowing the isolation of intact LPS of either rough or smooth types up to electrophoretic homogeneity has been developed. Under such methodology, sensible structural analysis through mass spectrometry and LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) activity of LPS individual species is feasible, composed of just a few chemical species. This methodology has proved the possible way of combining electrophoresis with other orthogonal separation principles, a further step which could guarantee the obtainment of chemically homogeneous preparations from complex LPS mixtures.

Keywords: lipopolysaccharides, isolation, chromatography, electrophoresis, reverse staining, elution, mass spectrometry

Introducción

Los lipopolisacáridos (LPS), también llamados endotoxinas, son componentes mayoritarios de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. En general, los LPS están formados por un dominio lipídico, llamado lípido A, que sirve de ancla en la membrana externa, el cual se enlaza a un oligopolisacárido que se extiende hacia el exterior de la bacteria. Una misma cepa bacteriana sintetiza de manera frecuente un gran número de especies moleculares de LPS.

Los LPS, como componentes integrales de la membrana externa, cumplen funciones esenciales para las bacterias y exhiben una gran variedad de actividades

biológicas e inmunológicas en otros organismos [1, 2]. Estos glicolípidos desempeñan un papel mediador clave en la infección bacteriana, la sepsis y el shock séptico [1, 2]. Los LPS son de interés, asimismo, porque estas biomoléculas y sus derivados sintéticos se emplean como antígenos o adyuvantes en la obtención de vacunas contra diversos agentes patógenos [3-5].

En este artículo de revisión se examinan varios aspectos de la separación de las especies moleculares de LPS. Primero se discute la complejidad de las mezclas de LPS sintetizadas por las bacterias: el elevado número de subespecies, la diversidad de estructuras

1. Morrison DC, Silverstein R, Luchi M, Shnyra A. Structure-function relationships of bacterial endotoxins. Contribution to microbial sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 1999;13:313-40.

2. Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Muller-Loennies S, Mamat U, et al. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;216:39-81.

3. Pier GB. Promises and pitfalls of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide as a vaccine antigen. *Carbohydr Res* 2003;338:2549-56.

químicas, y las diferencias en actividad biológica. A continuación se fundamenta la necesidad de la separación de las subespecies para el mejoramiento de la caracterización bioquímica de los LPS. Por último, se hace un análisis de los avances en el aislamiento de las especies moleculares y los problemas que muestran los métodos que se emplean para este propósito, desde el punto de vista de la homogeneidad de las preparaciones, su aplicabilidad a diversas fuentes de LPS y la compatibilidad con los métodos estándares para el análisis bioquímico de los LPS.

Heterogeneidad estructural de los lipopolisacáridos

En general, la estructura química de los LPS (Figura 1) comprende tres regiones: un lípido (llamado lípido A), un oligosacárido interno, que está unido al lípido A por el Kdo (ácido 3-desoxi-D-mano-octulosónico), y la cadena O específica, que está unida al oligosacárido interno [6]. La cadena O específica, que consiste en una secuencia repetida de unos pocos monosacáridos, presenta un grado variable de polimerización. Como consecuencia, hay LPS que no contienen la cadena O específica (conocidos como LPS de tipo rugoso), que solo tienen una unidad repetitiva (de tipo semirrugoso) (Figura 1), y los que tienen varias subunidades repetitivas en la cadena O específica (de tipo liso). A pesar de que la mayoría de las actividades biológicas del LPS se han asociado a la región lipídica de la molécula, la región del polisacárido también desempeña un papel funcional significativo [7-10].

Es común que los LPS producidos por una cepa bacteriana difieran con respecto (i) al número, la naturaleza, la longitud y la posición de los ácidos grasos del lípido A, (ii) a los sustituyentes de los grupos fosfato y el grado de fosforilación del lípido A, (iii) a la longitud, la secuencia y la composición de azúcares del oligopolisacárido, o (iv) a la sustitución del oligopolisacárido con grupos acetilo, fosfato y fosforiletanolamina. Como resultado de esto, el número de especies moleculares de LPS sintetizadas por una cepa bacteriana es usualmente grande. Por ejemplo, el patrón típico en forma de escalera que muestran los LPS de tipo liso, por la técnica de electroforesis en el gel plano de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio o desoxicolato de sodio, revela múltiples poblaciones de LPS con un grado diferente de polimerización de la cadena O específica (Figura 2). En otro ejemplo, en una cepa no tipable de *Haemophilus influenzae* se pudieron identificar 36 especies con estructuras diferentes del oligosacárido [11].

Las variantes moleculares de LPS pueden diferir también, de manera notable, en su actividad biológica en ensayos *in vitro* e *in vivo*. La ocurrencia natural de variaciones en la estructura química del lípido A, responsable de la mayoría de las actividades biológicas del LPS [12], se supone que induzca diferencias significativas entre las actividades biológicas de las especies moleculares de LPS. Esto se puede inferir por las relaciones estructura-función del lípido A, que se han establecido en estudios biológicos con lípidos A obtenidos de fuentes naturales o sus estructuras sintéticas [13-16].

Además de la región del lípido A, la heterogeneidad estructural asociada a la cadena O-polisacáridica

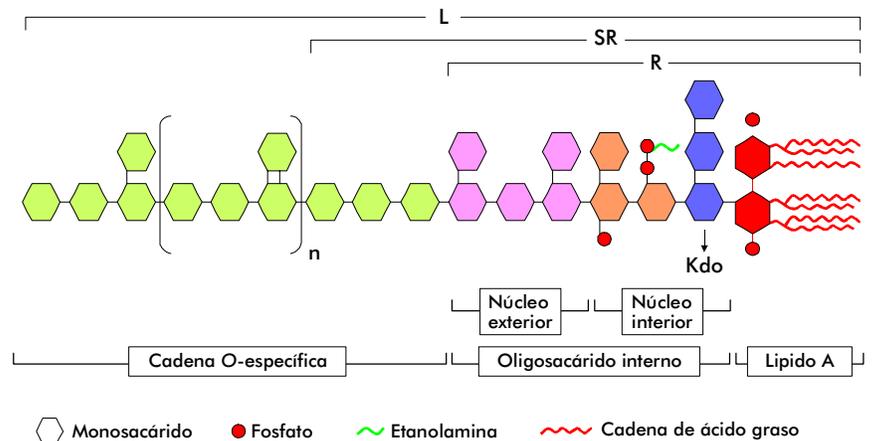


Figura 1. Esquema de la estructura química general de los lipopolisacáridos bacterianos: lípido A, oligosacárido interno y cadena O-específica. Los LPS de tipo rugoso (R) no contienen la cadena O-específica, los de tipo semirrugoso (SR) solo contienen una unidad repetitiva de la cadena O-específica, y los de tipo liso (L) contienen dos o más unidades repetitivas de la cadena O-específica.

constituye otra fuente de variación de la actividad biológica de las especies de LPS. Por ejemplo, el mecanismo de activación por los LPS de tipo liso de macrófagos o de células semejantes, puede ser diferente del de los LPS de tipo rugoso [17]. Ambos LPS muestran diferencias cualitativas que los distinguen en sus interacciones con el sistema del complemento y exhiben una distribución diferente en los órganos *in vivo*. Mientras la absorción hepática de los LPS de tipo liso desde la sangre ocurre de manera exclusiva por las células sinusoidales (células de Kupffer), la absorción de los lipopolisacáridos de tipo rugoso

4. Hu WG, Berry J, Chen J. Exploration of *Moraxella catarrhalis* outer membrane proteins, CD and UspA, as new carriers for lipooligosaccharide-based conjugates. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004;41: 109-15.

5. McCluskie MJ, Weeratna RD. Novel adjuvant systems. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2001;1:263-71.

6. Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res* 2003;338:2431-47.



Figura 2. Separación mediante electroforesis en gel plano de poliacrilamida en presencia de desoxicolato de sodio de LPS aislados de bacterias Gram negativas de tipo liso. Carril a) *Salmonella minnesota*; carril b) *Escherichia coli* K-235. Los lipopolisacáridos separados se visualizaron mediante la tinción con plata. En cada carril, cada banda representa una población diferente de moléculas de LPS.

ocurre a través de las células de Kupffer y por los hepatocitos [18]. La interacción de los LPS de tipo liso y rugoso con la lipoproteína de alta densidad *in vivo* es también diferente; como consecuencia, en las glándulas suprarrenales se acumulan grandes cantidades de LPS de tipo liso, mientras que son insignificantes las cantidades de LPS de tipo rugoso en este órgano [19].

Las distintas formas moleculares de LPS pueden diferir también con respecto al mecanismo de activación celular. En estudios recientes con LPS de cepas salvajes y mutantes de *Salmonella* y *Escherichia coli*, de fenotipo rugoso, se determinó que el LPS de tipo rugoso activa sin dificultad a las células que expresan el receptor de señalización de LPS, compuesto por el receptor de tipo Toll 4 y la proteína mioide de diferenciación 2 (TLR4/MD-2). El LPS de tipo liso requiere para activar a este mismo receptor, además, la ayuda de las proteínas de unión a LPS (LBP y CD14) [20]. Esta conclusión se derivó de un experimento *in vitro* de activación con LPS de mastocitos, que no expresan la proteína de membrana CD14. El LPS de tipo rugoso fue un potente inductor de la producción de interleucina-6 y el factor de necrosis tumoral- α en estas células; en cambio, el LPS de tipo liso careció de actividad estimuladora [20]. Como resultado de este hallazgo se pudo determinar que en condiciones fisiológicas, el LPS de tipo rugoso activa un mayor espectro de células que el LPS de tipo liso. Además, ya que los LPS de las bacterias salvajes (de fenotipo liso) también contienen una fracción de LPS de baja masa molecular de tipo rugoso, se especula que la contribución de los LPS de tipo rugoso a la respuesta inmune y a la fisiopatología de la infección provocada por las bacterias Gram negativas pudiera ser mayor que la de las formas de LPS de tipo liso [20].

Importancia de los métodos de separación para el análisis bioquímico de los lipopolisacáridos

Ante la naturaleza tan compleja de las moléculas de LPS se impone el uso de técnicas analíticas sofisticadas y, con frecuencia, de diferentes métodos bioquímicos para su caracterización estructural. La resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas (MS) se complementan para determinar las estructuras más representativas del LPS. Sin embargo, de forma usual se hacen análisis sobre LPS obtenidos a partir de bacterias crecidas en gran escala, pues se requieren cantidades apreciables. Esto impide la caracterización de los LPS cuando se tienen cantidades muy escasas (*e.g.*, en muestras tomadas directamente de pacientes infectados). El análisis de los LPS de muestras clínicas, a partir del crecimiento de la bacteria en un medio externo, tiene el inconveniente de que estas biomoléculas pueden variar su estructura durante el cultivo celular, un fenómeno denominado "variación de fase", que ocurre por la utilización de rutas alternativas de biosíntesis de sus oligopolisacáridos [21].

La sensibilidad de los métodos de caracterización estructural de LPS ha aumentado de manera notable a partir del empleo de una técnica de separación, la electroforesis capilar de los LPS O-desacilados, en combinación con la MS [22]. Esta metodología ha permitido el análisis de cantidades de LPS tan peque-

ñas como las expresadas por unas pocas colonias bacterianas [23].

Sin embargo, la caracterización estructural de los LPS tiene la dificultad de que, a menudo, su estructura se infiere a partir del análisis de sus fragmentos (LPS O-desacilado, lípido A, oligopolisacárido), en diferentes reacciones de hidrólisis. Debido a que determinadas condiciones de hidrólisis pueden también provocar la pérdida de grupos sustituyentes que están unidos al esqueleto glicosídico de los LPS, no se puede conocer de forma completa la heterogeneidad natural de estas biomoléculas.

Una solución a este problema es el análisis estructural directo de las especies intactas de LPS. La MS de desorción por plasma, y más tarde la MS de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS), han permitido el análisis estructural de moléculas intactas de LPS de pequeña masa molecular de tipo rugoso [24]. Sin embargo, la naturaleza anfipática y la gran heterogeneidad de los LPS de tipo liso obstaculizan su análisis por MS. Por lo general, el espectro de masas de MALDI de LPS intactos de tipo liso muestra una serie de picos anchos de iones muy poco resueltos [25, 26]. A partir de estos espectros solo es posible conocer la diferencia de masa entre los principales componentes y deducir la masa de la unidad repetitiva de la cadena O-específica [25, 26]. El espectro complejo de los LPS de tipo liso no permite obtener ninguna información sobre la composición del lípido A [12]. En consecuencia, no ha sido posible la determinación de la variabilidad estructural del lípido A, el componente de LPS más importante desde el punto de vista biológico, entre las glicofórmulas individuales de LPS de tipo liso. En muy pocos estudios, solo después del fraccionamiento de las mezclas de LPS, se han podido conocer las diferencias promedio entre los patrones de acilación del lípido A de las especies de LPS de cadenas polisacáridicas cortas y largas, aunque con poca resolución [27, 28]. Por ejemplo, el análisis por MS de desorción por plasma de dos fracciones cromatográficas, aún heterogéneas, de baja masa molecular (tipo rugoso) y alta masa molecular (tipo liso) del LPS de *E. coli* O97, mostró que la fracción de LPS tipo rugoso se encuentra tetra-acilada, mientras que la de tipo liso se encuentra hexa-acilada [28]. En un estudio diferente se halló que la fracción de LPS tipo liso de *Salmonella abortus equi* tiene un menor grado de acilación que la fracción de tipo rugoso [27]. Todo lo expresado indica que el empleo de métodos de separación de alta resolución que preserven la integridad química de los LPS y su combinación con las técnicas más sensibles de análisis estructural (*e.g.*, MALDI-TOF MS, ESI-MS), pueden contribuir a conocer de manera más completa la estructura química nativa de estas biomoléculas.

La enorme dificultad para la separación de los LPS ha provocado que hasta hoy la mayor parte de los estudios biológicos con LPS de fuentes naturales hayan definido la actividad biológica de estos glicolípidos a partir de preparaciones heterogéneas. En muy pocos casos se han utilizado preparaciones completamente homogéneas, tales como el LPS tipo *Re* de *Rhodobacter sphaeroides* [29]. Como consecuencia, en la mayoría de los estudios, no se ha podido determinar la actividad biológica directa de las diferentes especies moleculares

7. Muroi M, Tamamoto KI. The polysaccharide portion plays an indispensable role in *Salmonella* lipopolysaccharide-induced activation of NF- κ B through human toll-like receptor 4. *Infect Immun* 2002;70:6043-7.

8. Brade L, Engel R, Christ WJ, Rietschel ETH. A nonsubstituted primary hydroxyl group in position 6' of free lipid A is required for binding of lipid A monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1997;65:3961-5.

9. Caroff M, Cavaillon JM, Fitting C, Haefner-Cavaillon N. Inability of pyrogenic, purified *Bordetella pertussis* lipid A to induce interleukin-1 release by human monocytes. *Infect Immun* 1986;54:465-71.

10. Haefner-Cavaillon N, Caroff M, Cavaillon JM. Interleukin-1 induction by lipopolysaccharides: structural requirements of the 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO). *Molec Immunol* 1989;26:485-94.

11. Haefner-Cavaillon N, Carreno MP, Aussel L, Caroff M. Molecular aspects of endotoxins relevant to their biological functions. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:853-60.

12. Zahringer U, Lindner B, Rietschel ET. Chemical structure of lipid A. Recent advances in structural analysis of biologically active molecules. In: Brade H, Opal SM, Vogel SN, Morrison DC (editors). *Endotoxin in Health and Disease*. New York: Marcel Dekker Inc; 1999, p. 93-114.

13. Laude-Sharp M, Haefner-Cavaillon N, Caroff M, Lantreibecq F, Pusineri C, Kazatchkine MD. Dissociation between the interleukin 1-inducing capacity and Limulus reactivity of lipopolysaccharides from gram-negative bacteria. *Cytokine* 1990;2:253-8.

14. Koyama S, Sato E, Nomura H, Kubo K, Miura M, Yamashita T, et al. The potential of various lipopolysaccharides to release IL-8 and G-CSF. *Am J Physiol* 2000;278:L658-66.

15. Paeng N, Kido N, Schmidt G, Sugiyama T, Kato Y, Koide N, et al. Augmented immunological activities of recombinant lipopolysaccharide possessing the mannose homopolymer as the O-specific polysaccharide. *Infect Immun* 1996;64:305-9.

16. Blondiau C, Lagadec P, Lejeune P, Onier N, Cavaillon JM, Jeannin JF. Correlation between the capacity to activate macrophages *in vitro* and the antitumor activity *in vivo* of lipopolysaccharides from different bacterial species. *Immunobiology* 1994;190:243-54.

17. Kirikae T, Schade FU, Kirikae F, Rietschel ETH, Morrison DC. Isolation of a macrophage-like cell line defective in binding of lipopolysaccharide. Influence of serum and lipopolysaccharide chain length on macrophage activation. *J Immunol* 1993;151:2742-52.

18. Freudenberg MA, Freudenberg N, Galanos C. Time course of cellular distribution of endotoxin in liver, lungs and kidneys of rats. *Br J Exp Path* 1982;63:56-65.

19. Freudenberg MA, Bog-Hansen TC, Back U, Galanos C. Interaction of lipopolysaccharides with plasma high-density lipoprotein in rats. *Infect Immun* 1980;28:373-80.

de LPS y derivar relaciones precisas entre la estructura y la función de estas biomoléculas. Por tanto, el desarrollo de métodos que permitan el aislamiento de las glicofomas individuales de LPS hasta la homogeneidad, es un objetivo vigente, ya que ello puede contribuir de manera notable a la determinación de las propiedades biológicas de estas macromoléculas.

Soluciones para el aislamiento de las especies moleculares de lipopolisacáridos

El fraccionamiento de los LPS en sus especies moleculares a escala semipreparativa o preparativa es extremadamente difícil por su elevada heterogeneidad y tendencia a formar agregados moleculares. La presencia de estructuras lipofílicas, polares e iónicas en los LPS, hace que estos glicocombinados sean muy anfipáticos, y poco solubles en agua o en la mayoría de los solventes orgánicos [6]. Por ejemplo, la concentración crítica de agregación de los LPS de tipo liso de *E. coli* O111:B4, *E. coli* O55:B5, *S. abortus equi*, *Salmonella typhimurium* y *Serratia marcescens* se encontró en el intervalo entre 10 y 38 µg de LPS/mL [30]. La agregación de los LPS, además, produce entidades multimoleculares grandes y polidispersas, de masas moleculares en el intervalo entre 10³ y 10⁶ Da [31, 32]. Como consecuencia, la separación de los LPS por diversos principios se ha tenido que combinar con métodos que permitan su desagregación.

A continuación se describen y analizan los diversos métodos de aislamiento de LPS, y se hace énfasis en el desempeño de los siguientes parámetros: (i) la pureza del LPS, (ii) la preservación de la integridad química de la molécula, (iii) la aplicabilidad a fuentes de LPS diversas y (iv) la compatibilidad con los métodos de caracterización estructural y biológica del LPS.

Extracción líquido-líquido

Se han descrito al menos 18 métodos diferentes para la extracción de los LPS de las bacterias. Entre los más utilizados están el fenol caliente-agua [33], el fenol-cloroformo-éter de petróleo [34], y el método de Hitchcock y Brown, que incluye la extracción con dodecil sulfato de sodio (SDS) y la digestión con proteinasa K [35]. El resultado de la aplicación de estos métodos es la separación del LPS de otros tipos de biomoléculas (e.g., proteínas, ADN) que conforman el microorganismo. Por lo general, las preparaciones que se obtienen son muy heterogéneas en términos de especies moleculares de LPS, pero son relativamente puras en cuanto al contenido de contaminantes proteicos, ADN y fosfolípidos. Como etapa inicial de purificación, es útil la extracción líquido-líquido, ya que facilita la separación posterior de las especies moleculares de LPS mediante el uso de otras técnicas.

Cromatografía líquida

Para la separación de las especies de LPS se han usado diversos métodos cromatográficos: cromatografía en contracorriente [36], filtración en gel [37], intercambio iónico [38], interacciones hidrofóbicas [39], en gel de sílica [40], de hidroxiapatita [41] y fase inversa [42, 43]. A pesar de la variedad de principios de separación en que se basan, por lo general estos métodos producen fracciones de LPS no homogéneas.

Por ejemplo, la cromatografía en contracorriente, que se basa en la partición diferencial de las formas lisas y rugosas de LPS entre la fase acuosa y la orgánica, se ha utilizado para el fraccionamiento del LPS de las cepas salvajes de *Salmonella enterica*, *S. serovars abortus equi* y *S. friedenaui* y de *Citrobacter freundii*. Las dos fracciones contienen varias especies de LPS de cadena polisacárida larga o que no contenían la cadena O-específica [36]. Por otro lado, la cromatografía de filtración en gel Sephadex G-200 o Sepharose 4B en presencia de los detergentes SDS o DOC (dodecil sulfato de sodio), que se ha usado mucho para la separación del LPS en función de la masa molecular, por lo general produce entre dos y tres fracciones heterogéneas de lipopolisacáridos [37].

También, las cromatografías de interacciones hidrofóbicas en gel de octil-sepharose, de absorción en gel de sílica o en gel de hidroxiapatita se emplearon para la separación del LPS de tipo liso de *S. typhimurium* y *S. abortus equi*; *Yersinia enterocolitica* O:11,17, *E. coli* O97 y *S. typhimurium* LT2; o de varias cepas de *Bordetella pertussis*, respectivamente. El LPS se separó en dos tipos de fracciones, que contenían las poblaciones de LPS de tipo liso o rugoso [28, 39, 40].

La cromatografía de intercambio iónico en intercambiadores aniónicos de amina terciaria (e.g., la resina Amberlite XE 220) se ha utilizado para la separación de los LPS nativos [38]. Aunque se pudo demostrar que las fracciones obtenidas tenían diferentes propiedades biológicas y estructurales, no se pudo demostrar su pureza (e.g., mediante un método de mayor poder de separación de LPS, tal como la SDS-PAGE). Este método cromatográfico tiene además los inconvenientes de que utiliza un agente de elución alcalino fuerte, que puede modificar las propiedades del LPS y que no permite recuperar algunas de las fracciones de LPS de la columna cromatográfica debido a la afinidad muy alta de estas por la resina.

La cromatografía de alta resolución en fase inversa se ha empleado en la purificación de LPS de un homogeneizado de *Klebsiella pneumoniae* O1 K2. Mediante este método se obtuvo una preparación de LPS libre de proteínas pero heterogénea, con las mismas propiedades biológicas que la extraída con el método de fenol caliente-agua [41].

La cromatografía de capa delgada (TLC) es uno de los métodos más rápidos y sencillos que se utilizan para la separación de los glicolípidos. Esta se ha utilizado recientemente para la microextracción directa y el análisis de LPS nativos de tipo rugoso mediante la espectrometría de masa MALDI [44]. Sin embargo, la TLC tiene una resolución limitada para los LPS nativos, y ha probado ser útil solo en la separación parcial de las especies de LPS de pequeña masa molecular y de poca complejidad. También se han encontrado dificultades en la extracción de los LPS de las placas de TLC, debido a la contaminación de estos con el gel de sílica y a una baja recuperación del LPS [45].

En resumen, no se han logrado preparaciones completamente homogéneas con ninguno de los métodos cromatográficos que se han empleado de forma individual para la purificación de las especies moleculares de LPS. Esta conclusión ha sugerido que quizás sea necesaria la combinación de varios principios ortogonales para poder separar las diferentes heterogéneas

20. Huber M, Kalis C, Keck S, Jiang Z, Georgel P, Du X, et al. R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells. *Eur J Immunol* 2006;36:701-11.

21. Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 2002;71:635-700.

22. Lamari FN, Gioldassi XM, Mitropoulou TN, Karamanos NK. Structure analysis of lipoglycans and lipoglycan-derived carbohydrates by capillary electrophoresis and mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 2002;16:116-26.

23. Li J, Thibault P, Martin A, Richards JC, Wakarchuk WW, Van der Wilp W. Development of an on-line preconcentration method for the analysis of pathogenic lipopolysaccharides using capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. Application to small colony isolates. *J Chromatogr A* 1998;817:325-36.

24. Caroff M, Deprun C, Karibian D. 252Cf plasma desorption mass spectrometry applied to the analysis of underivatized rough-type endotoxin preparations. *J Biol Chem* 1993;268:12321-4.

25. Czaja J, Jachymek W, Niedziela T, Lugowski C, Aldova E, Kenne L. Structural studies of the O-specific polysaccharide from *Plesiomonas shigelloides* strain CNCTC 113/92. *Eur J Biochem* 2000;267:1672-9.

26. Plotz BM, Lindner B, Stetter KO, Holst O. Characterization of a novel lipid A containing D-galacturonic acid that replaces phosphate residues. The structure of the lipid A of the lipopolysaccharide from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex pyrophilus*. *J Biol Chem* 2000;275:11222-8.

27. Jiao BH, Freudenberg M, Galanos C. Characterization of the lipid A component of genuine smooth-form lipopolysaccharide. *Eur J Biochem* 1989;180:515-8.

28. Lebbar S, Karibian D, Deprun C, Caroff M. Distribution of lipid A species between long and short chain lipopolysaccharides isolated from *Salmonella*, *Yersinia*, and *Escherichia* as seen by 252Cf plasma desorption mass spectrometry. *J Biol Chem* 1994;269:31881-4.

29. Jarvis BW, Qureshi N. Inhibition of lipopolysaccharide-induced transcription factor Sp1 binding by spectrally pure di-phosphoryl lipid A from *Rhodobacter sphaeroides*, protein kinase inhibitor H-8, and dexamethasone. *Infect Immun* 1997;65:1640-3.

30. Aurell CA, Wistrom AO. Critical aggregation concentrations of Gram negative bacterial lipopolysaccharides (LPS). *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:119-23.

31. Ribi E, Anacker R, Brown W, Haskins WT, Malmgren B, Milner KC, et al. Reaction of endotoxin and surfactants. I. Physical and biological properties of endotoxin treated with sodium deoxycholate. *J Bacteriol* 1966;92:1493-1509.

32. Shands JW Jr., Chun PW. The dispersion of gram-negative lipopolysaccharide by deoxycholate. Subunit molecular weight. *J Biol Chem* 1980;255:1221-6.

33. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr Chem* 1965;5:83-91.

dades de los LPS (*e.g.*, carga eléctrica, hidrofobicidad, tamaño molecular).

Esta idea se ha demostrado con la purificación hasta homogeneidad del LPS más simple (tipo *Re*, que consiste en el lípido A unido a dos unidades de Kdo) de *E. coli* D31m4, mediante el uso de la combinación de las cromatografías de intercambio iónico y la fase inversa de alta resolución (RP-HPLC) [46]. El LPS que se extrajo del mutante rugoso *Re* de *E. coli* D31m4, se desaregó con 0.1 M EDTA y se fraccionó en una columna de dietilaminoetil-celulosa. En este paso cromatográfico se obtuvo la forma bifosforilada del lipopolisacárido, que se separó de los fosfolípidos y otras formas cargadas de LPS. Para separar la forma mayoritaria hexacilada de otras formas presentes en esta preparación, como la pentacilada, se realizó una cromatografía de fase reversa (C18) a la preparación de LPS. En esta cromatografía se separó el glicolípido nativo con el empleo de la sal de tetrabutilamonio, un agente que desagrega el LPS. Cuando se analizó por MS, el LPS purificado mostró una completa homogeneidad. A pesar de que este resultado evidenció por primera vez que es posible aislar el LPS hasta homogeneidad, el procedimiento de purificación se aplicó solo al LPS más simple, tipo *Re*, y no se ha podido usar con éxito en la separación de otros tipos más complejos de LPS (*e.g.*, lisos).

Electroforesis

Electroforesis capilar

Para la caracterización estructural de los LPS, uno de los métodos de separación modernos más utilizados, es la electroforesis capilar en combinación con la MS [22, 47]. La separación mediante electroforesis capilar de los LPS O-desacilados de tipo rugoso es muy resolutive. Esta permite, *e.g.*, la separación de glicofomas que difieren solo en un grupo fosfato [48]. Su conexión en línea con la MS de tipo ESI es un método de análisis estructural de muy alta resolución y sensibilidad [48, 49]. Sin embargo, esta técnica tiene la desventaja de que durante la O-desacilación del LPS con medios alcalinos se pueden liberar algunas proporciones de los grupos fosfato [50, 51] y fosfoetanolamina del LPS. De esta manera se introduce una heterogeneidad que no se expresa de forma natural en el LPS, y se hace más complicado su análisis estructural.

El LPS intacto, en cambio, no se ha podido separar y analizar con igual éxito mediante la electroforesis capilar. Esto se debe a que el LPS es muy poco soluble en las soluciones tampón que emplea esta técnica. Por otro lado, la separación del LPS nativo de tipo liso en presencia de detergentes (*e.g.*, SDS), muestra una baja resolución [52]. La electroforesis capilar tampoco se ha podido utilizar para el aislamiento de LPS nativos y su caracterización en ensayos de actividad biológica.

Electroforesis en gel de poliacrilamida de formato cilíndrico, en presencia de detergentes

La electroforesis de tipo DOC-PAGE preparativa de formato cilíndrico, se ha utilizado con éxito para la separación de diferentes glicofomas de LPS de varios microorganismos, con una alta pureza [53, 54]. Además de los diferentes tipos de LPS (rugoso, semirrugoso, liso), se logran separar diversas especies

de LPS con diferentes tamaños moleculares de tipo liso o semi-liso [53]. Sin embargo, no se ha podido demostrar la utilidad de este formato para la caracterización biológica y estructural de las especies individuales de LPS. De hecho, las especies individuales purificadas se tuvieron que mezclar de nuevo en fracciones heterogéneas (de tipo rugoso o liso) para poder determinar su composición de monosacáridos [54]. Esta técnica tiene además la desventaja de que carece de un método para la detección en línea de los LPS electroeluidos. Como consecuencia, el fraccionamiento de los LPS es difícil e impreciso, y en ocasiones provoca la mezcla de especies de LPS que se han separado con anterioridad en el gel. Por otro lado, el LPS se eluye en presencia de detergentes y sales, que interfieren con el análisis posterior de estas moléculas por ensayos biológicos o MS.

Electroforesis en el gel plano de poliacrilamida, en presencia de detergentes

Los estudios sistemáticos sobre la separación de moléculas de LPS por electroforesis en gel plano de poliacrilamida (slab-PAGE), que se realizaron mediante el uso de quimiotipos de LPS caracterizados en términos químicos (*e.g.*, *Salmonella* [35]), mostraron cómo las diferencias en los perfiles de separación de LPS detectados con plata [55] correlacionan con las diferencias en estructura química entre los LPS. De hecho, los glicolípidos de tipo liso, que difieren solo en los azúcares componentes de las cadenas O, se separan con un patrón diferencial de tipo escalera [35]. De igual forma, la movilidad de la banda de LPS de mayor migración de los quimiotipos de mutantes bacterianos (Rd, Rc, Rb y Ra) se incrementa a medida que el oligosacárido interno se acorta [35]. Por otra parte, las inconsistencias en la separación, tales como las bandas en forma de dobletes, difusas o de baja velocidad de migración, que se producen como resultado de la disociación incompleta de los agregados de LPS durante la electroforesis, se han resuelto mediante electroforesis al gel antes de la separación o por medio del incremento de la concentración de SDS en el gel [56]. Para resolver este problema, el SDS se reemplazó con desoxicolato de sodio, que disoció con mayor eficiencia los multímeros de LPS y generó patrones bien resueltos de los LPS de tipo liso y rugoso [57]. Una mayor resolución de los LPS se puede obtener también en slab-SDS-PAGE mediante el cambio del sistema de tampón convencional a tricina [58], o por el uso de gradientes de concentración de gel de poliacrilamida [59]. En consecuencia, hoy se cuenta con métodos muy efectivos para disociar las mezclas de LPS en sus monómeros y separar, de forma reproducible, las especies nativas de LPS con una resolución elevada a través de slab-PAGE.

Es importante hacer notar que la técnica de slab-PAGE, sin embargo, hasta hace poco no se había podido utilizar de forma extensiva con propósitos preparativos, debido a que el método más convencional y sensible para la visualización de los LPS separados en el gel, la tinción con plata [55], causa la modificación química y la fijación irreversible de estas macromoléculas en el gel. Ello conspiraba contra la recuperación de las glicofomas individuales de LPS. Como consecuencia, la localización y la escisión de las bandas de LPS se

34. Galanos C, Luderitz O, Westphal O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur J Biochem* 1969; 9: 245-9.

35. Hitchcock PJ, Brown TM. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J Bacteriol* 1983;154:269-77.

36. Suda Y, Shiyama T, Yasukochi T, Kawano K, Brade H, Rietschel ET, et al. Separation of wild-type lipopolysaccharides by centrifugal partition chromatography: isolation of smooth form species. *J Endotoxin Res* 1996;3:1-7.

37. Yeh HY, Jacobs DM. Characterization of lipopolysaccharide fractions and their interactions with cells and model membranes. *J Bacteriol* 1992;174:336-41.

38. Nowotny A. Heterogeneity of endotoxic bacterial lipopolysaccharides revealed by ion-exchange column chromatography. *Nature* 1966;210:278-80.

39. Fischer W. Purification and fractionation of lipopolysaccharide from gram-negative bacteria by hydrophobic interaction chromatography. *Eur J Biochem* 1990;194:655-61.

40. Le Dur A, Chaby R, Szabo L. Isolation of two protein-free and chemically different lipopolysaccharides from *Bordetella pertussis* phenol-extracted endotoxin. *J Bacteriol* 1980;143:78-88.

41. Kol O, Montreuil J, Fournet B, Zaliss R, Smets P. Purification of the lipopolysaccharide fraction from *Klebsiella pneumoniae* O1 K2 by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1987; 396:281-6.

42. Komuro T, Yomota C, Kimura T, Galanos C. Comparison of R- and S-form lipopolysaccharides fractionated from *Escherichia coli* UKT-B lipopolysaccharide in pyrogen and Limulus tests. *FEMS Microbiol Lett* 1989;51:79-83.

43. Hardy E, Pupo E, Castellanos-Serra L, Reyes J, Fernández-Patrón C. Sensitive reverse staining of bacterial lipopolysaccharides on polyacrylamide gels by using zinc and imidazole salts. *Anal Biochem* 1997;244:28-32.

44. Therisod H, Labas V, Caroff M. Direct microextraction and analysis of rough-type lipopolysaccharides by combined thin-layer chromatography and MALDI mass spectrometry. *Anal Chem* 2001; 73: 3804-7.

45. Chen CH, Chang C, Nowotny AM, Nowotny A. Rapid biological and chemical analyses of bacterial endotoxins separated by preparative thin-layer chromatography. *Anal Biochem* 1975;63: 183-94.

46. Qureshi N, Takayama K, Mascagni P, Honovich J, Wong R, Cotter RJ. Complete structural determination of lipopolysaccharide obtained from deep rough mutant of *Escherichia coli*. Purification by high performance liquid chromatography and direct analysis by plasma desorption mass spectrometry. *J Biol Chem* 1988; 263: 11971-6.

47. Zamfir A, Peter-Katalinic J. Capillary electrophoresis-mass spectrometry for glycoscreening in biomedical research. *Electrophoresis* 2004;25:1949-63.

había tenido que hacer de manera muy imprecisa: por seccionamiento de los geles, sin tñir, en dos o tres regiones de bandas de LPS y su comparación posterior con otro gel corrido en paralelo tñido con plata. El resultado era que las fracciones de LPS recuperadas de slab-PAGE continuaban mostrando, en general, mucha heterogeneidad [42, 60, 61].

La separación preparativa de los LPS por slab-PAGE es difícil, debido a que *i*) del gel se debe recuperar un número elevado de fracciones (*e.g.*, generalmente más de 10 para los LPS de tipo liso); *ii*) se necesita una precisión elevada para localizar y escindir las bandas separadas de LPS, de manera que se evite la mezcla de las fracciones de LPS que se resolvieron con anterioridad en el gel; *iii*) se requiere una eficiencia de recuperación del LPS elevada, que permita obtener cantidades suficientes de las especies minoritarias de LPS para su evaluación en los ensayos biológicos estándares; *iv*) los LPS se deben recuperar del gel sin modificar sus propiedades biológicas; y *v*) los LPS que se recuperan del gel se deben liberar de los detergentes o las sales asociados a la electroforesis o la elución, y así evitar que estos agentes químicos interfieran con el análisis biológico posterior del LPS.

Recientemente, en una primera etapa, para superar la mayoría de estos obstáculos, se investigó y estableció un método de tinción inversa, sensible y no destructiva del LPS separado en el gel [42, 62, 63]. En una segunda etapa, se descubrió que las bandas individuales de LPS pueden difundir de manera rápida y eficiente en una solución de 5% de trietilamina cuando estas se extruyen hasta producir micropartículas de gel de un tamaño promedio de 32 mm [64]. Basada en estos principios, se estableció una nueva metodología de aislamiento que combina la separación por electroforesis en gel plano de poliacrilamida, la tinción inversa, la extrusión y la elución pasiva, para aislar hasta homogeneidad electroforética cantidades de microgramos de especies individuales de LPS, a partir de mezclas complejas de LPS de tipo rugoso o liso (Figura 3) [65-67].

Las cantidades de las fracciones obtenidas a partir de dos fuentes de LPS (*Vibrio fischeri* cepa HMK y *H. influenzae* Rd) fueron suficientes para su análisis estructural por MS de tipo ESI o MALDI-TOF [65, 66]. Por primera vez se pudo determinar la abundancia relativa y las características estructurales de las especies moleculares contenidas en cada banda de slab-PAGE (*e.g.*, la masa molecular exacta y la secuencia de sus oligosacáridos por ESI-MS o ESI-MS/MS, y el estado de fosforilación del lípido A, la masa molecular exacta de sus oligosacáridos intactos o de sus LPS *O*-desacilados por MALDI-TOF-MS). Estos análisis confirmaron que el método de aislamiento no alteró la integridad química del LPS [65, 66]. Esta es la primera vez que la separación con alta resolución de los LPS por slab-PAGE se corresponde con el análisis estructural de LPS por MS, lo que representa un gran paso de avance hacia la correlación directa de los ensayos químicos y biológicos.

Este método de aislamiento no modifica las propiedades bioquímicas (*e.g.*, inducción de TNF- α) de estas biomoléculas [63]. En otro ejemplo, las cantidades purificadas de quince especies individuales del LPS de tipo liso de *E. coli* K-235 (entre 280 ng y 411 mg) fueron suficientes para cuantificar su actividad en el

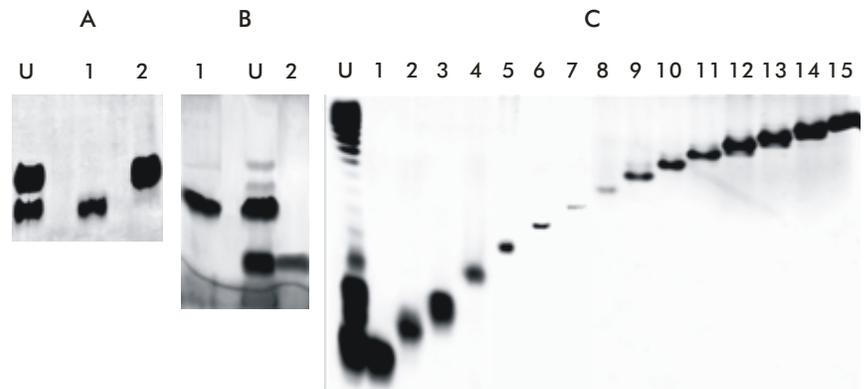


Figura 3. Análisis de las especies aisladas de LPS de diferentes bacterias Gram negativas mediante electroforesis en gel plano de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio o desoxicolato de sodio. A: 16% SDS-PAGE de los LPS de tipo rugoso de *Vibrio fischeri* cepa HMK. Carriles: U) mezcla de LPS sin fraccionar, 1) menor masa molecular, 2) fracción de LPS aislada de mayor masa molecular. B: 18% DOC-PAGE de las fracciones purificadas del LPS de *Pectinatus frisingensis* cepa VTT E-82164. La estructura química de la mezcla de LPS de tipo rugoso de *P. frisingensis* cepa VTT E-82164 se caracterizó de manera exhaustiva: contiene dos especies moleculares mayoritarias que difieren en longitud por un fragmento decaacárido [64]. Carriles: 1) y U) mezcla de LPS sin purificar; 2) especies mayoritarias purificadas de menor masa molecular. C: 15% DOC-PAGE de las especies aisladas del LPS de tipo liso de *E. coli* K-235. Carriles: U) mezcla de LPS, 1)-15) fracciones de LPS purificadas. Los geles en A y C se tñieron con plata. Los lipopolisacáridos en B se detectaron mediante la tinción inversa con sales de zinc e imidazol [42, 62, 63]. Los paneles A y C se adaptaron [65, 67].

ensayo de LAL [67]. Por vez primera es posible determinar la actividad LAL de especies de LPS de tipo liso con un nivel elevado de homogeneidad electroforética. Ya que las moléculas de LPS, en las cantidades obtenidas por esta metodología, son inductoras potentes de diversas respuestas biológicas (*e.g.*, inducción en células de la producción de TNF- α o del óxido nítrico *in vitro*, o toxicidad letal en ratones sensibilizados con D-galactosamina *in vivo*), se espera que este método de aislamiento sea útil también para el análisis de las especies individuales de LPS en otros ensayos biológicos.

Esta metodología tiene varias ventajas en comparación con otros métodos para la separación de las especies moleculares de los LPS complejos. Por primera vez el conjunto de bandas individuales de LPS de tipo liso resueltas por electroforesis en gel plano de poliacrilamida en presencia de desoxicolato de sodio (DOC-slab-PAGE) se ha aislado hasta la homogeneidad electroforética [67]. Con anterioridad, el patrón de bandas separadas por electroforesis en gel plano de poliacrilamida se había fraccionado mediante la escisión del gel sin tñir en dos o tres regiones [59, 60]. Aunque este método mostró ser útil para separar las fracciones de LPS rugoso de las de LPS liso, no permitió el fraccionamiento preciso de las bandas individuales de LPS. De hecho, al volver a analizar las fracciones purificadas de LPS mediante electroforesis, aparecieron varias especies [59, 60]. Comparada con el método de DOC-PAGE preparativa de formato cilíndrico, la metodología de aislamiento basada en la separación por electroforesis en gel plano de poliacrilamida también tiene la ventaja de que provee una detección y aislamiento más precisos de las especies individuales de LPS [51, 52]. Además, a diferencia de la técnica de DOC-PAGE en formato cilíndrico, las sales y los detergentes asociados a la electroforesis se lavan de la matriz del gel antes de la elución del LPS, y

48. Kelly J, Masoud H, Perry MB, Richards JC, Thibault P. Separation and characterization of *O*-deacylated lipooligosaccharides and glycans derived from *Moraxella catarrhalis* using capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 1996;233:15-30.

49. Thibault JL, Martin A, Richards JC, Wakarchuk WW, van der Wilp W. Development of an on-line preconcentration method for the analysis of pathogenic lipopolysaccharides using capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. Application to small colony isolates. *J Chromatogr A* 1998;817:325-36.

50. Horton D, Riley DA. ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta* 1981; 640:727-33.

51. Knirel YA, Helbig JH, Zahring U. Structure of a decaaccharide isolated by mild acid degradation and dephosphorylation of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas fluorescens* strain ATCC 49271. *Carbohydr Res* 1996;283:129-39.

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

53. Kim JS, Reuhs BL, Rahman MM, Ridley B, Carlson RW. Separation of bacterial capsular and lipopolysaccharides by preparative electrophoresis. *Glycobiology* 1996;6:433-7.

54. Rahman MM, Guard-Petter J, Carlson RW. A virulent isolate of *Salmonella enteritidis* produces a *Salmonella typhi*-like lipopolysaccharide. *J Bacteriol* 1997;179: 2126-31.

55. Tsai CM, Frasch CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1982; 5:115-9.

las fracciones de LPS recuperadas se liberan de estos contaminantes. La separación de las fracciones de LPS basada en DOC- electroforesis en gel plano de poli-acrilamida, ofrece varias ventajas sobre otros métodos cromatográficos que se han empleado para la separación del patrón completo de LPS [36-42, 68]. Estas incluyen una mayor resolución, combinada con una más alta reproducibilidad y menor costo.

Aunque las fracciones obtenidas mediante la metodología basada en electroforesis en gel plano de poli-acrilamida muestran una elevada homogeneidad electroforética, no se espera que sean completamente homogéneas en términos de especies moleculares [55, 65, 66]. El análisis por MS de las fracciones individuales de LPS permitió detectar microheterogeneidades que están por debajo de la resolución de slab-PAGE [65, 66]. Los espectros de masas de la fracción de menor masa molecular del LPS de *V. fischeri* HMK, y las fracciones de menor y mayor masa molecular del LPS de *H. influenzae* Rd, mostraron más de una especie molecular [65, 66]. Al correlacionar de forma indirecta los patrones de bandas de LPS generados por electroforesis en gel plano de poli-acrilamida con los espectros de masas de las especies de LPS [24, 69-71], se confirmó que slab-PAGE no es, de forma ordinaria, capaz de resolver pequeñas diferencias estructurales entre las especies de LPS, como la presencia o ausencia de sustituyentes de bajo peso molecular tales como los residuos de etanolamina, fosfatos o grupos acetilos unidos al esqueleto de poli/oligosacárido o al lípido A, ni puede resolver especies de LPS de masas moleculares muy cercanas que resultan de la adición de una cadena de ácido graso al lípido A. Por tanto, el próximo paso hacia el aislamiento de especies moleculares de LPS hasta homogeneidad química a partir de mezclas complejas de estos glicolípidos, probablemente necesitará de otros principios ortogonales de separación (*e.g.*, las cromatografías de intercambio iónico y de fase inversa de alta resolución) en combinación con la técnica de electroforesis en gel plano de poli-acrilamida.

No obstante, la aplicación exhaustiva de la metodología de aislamiento de especies individuales de LPS basada en electroforesis en gel plano de poli-acrilamida, combinado con el análisis simultáneo de las fracciones individuales por MS y ensayos biológicos puede brindar una nueva forma de obtener de manera más precisa

la información sobre la heterogeneidad química y funcional, y las relaciones estructura-función de las mezclas complejas de LPS. Estos estudios tendrán un impacto importante en el entendimiento del proceso de biosíntesis de los LPS y el papel de estas biomoléculas en la fisiopatología de la infección bacteriana, la sepsis y el shock séptico.

Conclusiones

La elevada heterogeneidad estructural de los LPS y su carácter anfipático complica extremadamente el aislamiento de sus especies moleculares. Se han aplicado varios métodos para la purificación de los lipopolisacáridos, con resultados todavía insatisfactorios en alguno de los siguientes parámetros de evaluación: (i) la homogeneidad química de las preparaciones de LPS, (ii) la preservación de la integridad química de la molécula, (iii) la aplicabilidad a fuentes de LPS diversas, (iv) la compatibilidad con los métodos de caracterización estructural y biológica del LPS. La separación de los LPS en un solo paso cromatográfico no ha podido conducir a la obtención de fracciones de LPS de homogeneidad adecuada. Incluso en su forma combinada, las cromatografías de intercambio iónico y de fase inversa de alta resolución han permitido la purificación hasta homogeneidad química solo de los LPS de tipo rugoso más simples.

Con los métodos de electroforesis, incluyendo el de formato capilar, preparativa de formato cilíndrico o en gel plano de poli-acrilamida, se han podido separar especies de masas moleculares cercanas de LPS más complejos de tipo liso. En este campo, una nueva metodología que combina las técnicas de electroforesis en gel plano de poli-acrilamida, tinción inversa, extrusión y elución pasiva ha permitido el aislamiento de LPS intactos de tipo rugoso o liso hasta la homogeneidad electroforética. Con esta metodología, se ha logrado el análisis estructural sensible por MS y la medición de la actividad biológica de las especies individuales (intactas) de LPS. Se ha demostrado que las fracciones aisladas poseen muy pocas especies químicas, y por ende, son mucho más homogéneas que sus contrapartes de origen. La combinación de la electroforesis con otros principios ortogonales de separación, probablemente constituirá un próximo paso necesario hacia la obtención de preparaciones químicamente homogéneas a partir de mezclas de LPS complejas.

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

57. Komuro T, Galanos C. Analysis of *Salmonella* lipopolysaccharides by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Chromatogr* 1988;450:381-7.

58. Lesse AJ, Campagnari AA, Bittner WE, Apicella MA. Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricaine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Immunol Methods* 1990;126:109-17.

59. Noda K, Kubota K, Yamasaki R. Separation of lipooligosaccharides by linear gradient gel electrophoresis. *Anal Biochem* 2000;279:18-22.

60. DiRienzo JM, MacLeod RA. Composition of the fractions separated by polyacrylamide gel electrophoresis of the lipopolysaccharide of a marine bacterium. *J Bacteriol* 1978;136:158-67.

61. Ohta M, Rothmann J, Kovats E, Phan PH, Nowotny A. Biological activities of lipopolysaccharide fractionated by preparative acrylamide gel electrophoresis. *Microbiol Immunol* 1985;29:1-12.

62. Hardy E. Detección con zinc-imidazol de biomoléculas en geles: aplicaciones analíticas y micropreparativas [dissertation]. La Habana: Habana Univ.;1998.

63. Hardy E, Pupo E, Santana H, Guerra M, Castellanos-Serra L. Elution of lipopolysaccharides from polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1998;259:162-5.

64. Pupo E, López CM, Alonso M, Hardy E. High-efficiency passive elution of bacterial lipopolysaccharides from polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 2000;21:526-30.

65. Pupo E, Phillips NJ, Gibson BW, Apicella MA, Hardy E. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry of lipopolysaccharide species separated by slab-polyacrylamide gel electrophoresis: high-resolution separation and molecular weight determination of lipooligosaccharides from *Vibrio fischeri* strain HMK. *Electrophoresis* 2004;25:2156-64.

66. Gulín S, Pupo E, Schweda EK, Hardy E. Linking mass spectrometry and slab-polyacrylamide gel electrophoresis by passive elution of lipopolysaccharides from reverse-stained gels: analysis of gel-purified lipopolysaccharides from *Haemophilus influenzae* strain Rd. *Anal Chem* 2003;75:4918-24.

67. Pupo E, Hardy E. Isolation of smooth-type lipopolysaccharides to electrophoretic homogeneity. *Electrophoresis* 2007;28:2351-7.
68. Goodman MG, Morrison DC, Weigle WO. Modulation of lipopolysaccharide (LPS)-mediated function by structural differences of two physically distinct fractions of *Escherichia coli* K235 LPS. *J Immunol* 1977;118:1852-7.
69. Gibson BW, Campagnari AA, Melaugh W, Phillips NJ, Apicella MA, Grass S, *et al.* Characterization of a transposon Tn916-generated mutant of *Haemophilus ducreyi* 35000 defective in lipooligosaccharide biosynthesis. *J Bacteriol* 1997;179:5062-71.
70. Cox AD, Hood DW, Martin A, Makepeace KM, Deadman ME, Li J, *et al.* Identification and structural characterization of a sialylated lacto-N-neotetraose structure in the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*. *Eur J Biochem* 2002;269:4009-19.
71. Post DM, Phillips NJ, Shao JQ, Entz DD, Gibson BW, Apicella MA. Intracellular survival of *Neisseria gonorrhoeae* in male urethral epithelial cells: importance of a hexaacyl lipid A. *Infect Immun* 2002;70:909-20.

Recibido en diciembre de 2007. Aprobado en julio de 2008.