

TÉCNICA SPOT SÍNTESIS Y SPOT ELISA COMO HERRAMIENTA PARA LA OBTENCIÓN DE BIBLIOTECAS DE PÉPTIDOS DE INTERÉS FARMACOLÓGICO

SPOT SYNTHESIS AND SPOT ELISA TECHNIQUE AS A TOOL FOR OBTAINING LIBRARIES OF PHARMACOLOGICAL

Diana Maritza Loaiza Parra*

Recibido: 30 de abril de 2019

Aceptado: 13 de junio de 2019

DOI: <https://doi.org/10.29097/2011-639X.237>

Resumen

El uso de péptidos como moléculas potenciales para tratamientos clínicos está siendo considerado por las compañías farmacéuticas interesadas en ampliar el mercado de estas, mediante el uso de herramientas tecnológicas de bajo costo y alto rendimiento. Esta investigación muestra los beneficios que ofrece la técnica spot síntesis en la obtención de bibliotecas de péptidos; técnica de fácil implementación que permite prever la viabilidad del péptido en el proceso de interés. Los resultados obtenidos posibilitaron la obtención de una biblioteca de péptidos. Este estudio sugiere la técnica spot ELISA como un método de reconocimiento de las secuencias según la presencia de aminoácidos críticos en la estructura peptídica, claves para su actividad en procesos farmacológicos.

Palabras clave: Fmoc, péptido, síntesis, spot, biblioteca.

Abstract

The use of peptides as potential molecules for clinical treatments, attracts the attention of pharmaceutical companies interested in expanding their market, making use of low-cost and high-performance technological tools. Therefore, it is of interest in this work to show the benefits offered by the spot synthesis technique in obtaining peptide libraries and suggest this as an easy-to-implement technique, which allows predicting the viability of the peptide in the process of interest. The results obtained made it possible to obtain a peptide library and the Spot ELISA technique was suggested as a method of recognition of the sequences according to the presence of critical amino acids in the peptide structure, key to their activity in pharmacological processes.

Keywords: Fmoc, peptide, synthesis, spot, library.

* Licenciada en Química, especialista en Biotecnología Agraria, magíster en Bioquímica. Profesora investigadora, grupo de investigación Proteoma, Universidad de La Sabana, Bogotá D. C., Colombia. ORCID: 0000-0002-7663-8452. diana.loaiza@unisabana.edu.co

INTRODUCCIÓN

Al igual que las proteínas, los péptidos son un grupo importante de biopolímeros de los aminoácidos que se encuentran asociados a todo tipo de organismos y cumplen funciones biológicas fundamentales, ya sea como hormonas, antibióticos, enzimas, entre otras (Lien y Lowman, 2003).

Los péptidos tienen un amplio espectro de aplicaciones clínicas, dentro las que se incluyen antibióticos, antifúngicos, antivirales, vacunas, desordenes neuronales, cáncer, entre otras; esto gracias a su alta especificidad y actividad, lo que genera baja toxicidad y pocos efectos secundarios, pues poseen una vida media corta (Lien y Lowman, 2003).

En vista de su importancia, la síntesis de estos compuestos ha llamado la atención de químicos, farmacéuticos e ingenieros, quienes se han interesado por obtenerlos de manera aislada y artificial para su manipulación y posterior aplicación en el área farmacológica, clínica e industrial, haciendo uso de técnicas que permitan mejorar los rendimientos en la reacción y posibiliten la obtención de péptidos sintéticos con mayor pureza. De este modo, en un primer momento, surgió la síntesis de péptidos en fase sólida, introducida por Merrifield en 1963, como un medio efectivo y rápido para la obtención de péptidos, el cual se ha enriquecido a lo largo del tiempo, dando lugar a péptidos más puros y muy parecidos a sus homólogos (Merrifield, 1964; Gutte y Merrifield, 1971).

El diseño y aplicación de estas técnicas para la preparación de los péptidos ha posibilitado un estudio más detallado de estos compuestos, permitiendo, entre otras cosas, evaluar las interacciones que ocurren entre las cadenas laterales de la estructura peptídica, las cuales sustentan la actividad biológica de estas biomoléculas en los seres vivos.

Dentro de los grandes avances que se han dado en las técnicas de síntesis de péptidos, vale la pena destacar la propuesta postulada por Ronald Frank en 1992 (Frank, 2002), quien introdujo no sólo una técnica rápida basada en un soporte polimérico de membrana de celulosa, conocida como spot síntesis, sino que también ofrecía la posibilidad de hacer sobre ella estudios que permitían reconocer y analizar sitios de unión de algunos anticuerpos en secuencias de péptidos inmovilizados, marcando un gran despliegue de oportunidades para la comunidad científica (Laune et ál., 2002).

Lo anterior ha representado un incremento en la disponibilidad de los péptidos sintéticos en el mercado. No obstante, esto ha generado una serie de dificultades en su producción, que depende de la complejidad de la estructura peptídica y la estrategia de síntesis para su obtención, lo que influirá de manera determinante en la estabilidad metabólica del péptido y en su pureza e incide notoriamente en el coste de su producción. Con base en lo expuesto, este trabajo muestra los beneficios de la técnica spot síntesis en la obtención de péptidos de forma masiva, a partir de la implementación de la estrategia de síntesis por Fmoc (Reineke, Sabat, Volk y Schneider-Mergener, 1998), técnica de bajo costo que además permite prever la viabilidad del péptido en el proceso de interés. Para esto se tomó como ejemplo un fragmento de la proteína gp63 del género leishmania (YSPVVIGYANGSSNQDASSAA), la cual presentó alta reactividad en sueros de paciente humano con leishmaniasis, obtenida en trabajos anteriores (Díaz, 2006). Esto favorecerá a instituciones dedicadas a la investigación, ya que genera mayores beneficios y mejores oportunidades de continuar con aquellos estudios relacionados con la producción de péptidos para uso farmacológico e industrial.

METODOLOGÍA

Materiales

Selección del péptido

La secuencia TAADGYAGLSANVRSDTAT corresponde a un fragmento de la proteína gp63 del parásito que produce leishmaniasis. Esta secuencia, descrita como el péptido (PT)50, fue seleccionada para esta investigación porque presentó la mayor reacción con sueros de pacientes humanos que padecían leishmaniasis, en un trabajo previo realizado por el grupo de investigación Proteoma de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas (Díaz, 2006).

Membrana

En el mercado hay una gran variedad de membranas preactivadas, derivadas en su mayoría de hojas de celulosa. Para este estudio se implementó papel Whatman, derivado de borra de algodón, pues ofrece una amplia variedad de retención y tasa de flujo para adaptarse a numerosas aplicaciones en laboratorio (Whatman, s.f.).

N, N-dimetilformamida (DMF)

Para el uso de DMF se debe verificar que este reactivo se encuentre desprovisto de radicales aminos libres a partir de una prueba con 1% de azul de bromofenol en DMF. De acuerdo con la coloración que tome el reactivo, sea amarillo o azul, el reactivo es óptimo o no para su uso, respectivamente (Espanela y van Huijsduijnen, 2004).

Fmoc aminoácidos

Los aminoácidos protegidos con Fmoc son conservados por debajo de los -80°C para mantener estable su actividad (Espanela y van Huijsduijnen, 2004).

N-aliloxicarbonilo

La conservación y activación de N-aliloxicarbonilo se procede como con cualquier otro aminoácido, tomando en cuenta el procedimiento mencionado por Espanela y van Huijsduijnen (2004).

Obtención de biblioteca de péptidos sobre membrana de celulosa

Tamizaje sistemático con Gly de la secuencia seleccionada

Como se expuso anteriormente y de acuerdo con estudios previos (Díaz, 2006), a partir de pruebas ELISA se determinó que el péptido (PT)50, cuya secuencia corresponde a TAADGYAGLSANVRSDTAT

de la proteína gp63 de *Leishmania*, presentó mayor reconocimiento por los anticuerpos presentes en el suero antileishmania que otras reportadas en dicho trabajo; por tanto, se tomó la secuencia peptídica y se procedió a dividirla en dos partes, tal como se muestra en la figura 1.



Figura 1. División de la secuencia (PT) 50, en dos péptidos de referencia (positivos) sobrelapados en 6 aminoácidos.

La finalidad de la diferenciación permite detectar con mayor rigurosidad los aminoácidos críticos para la reacción antígeno-anticuerpo en la secuencia peptídica por el tamizaje de dos series de péptidos análogos de las secuencias 1 (TAADGYYAGLSAN) y 2 (AGLSANVRS DTAT) antes descritas, que resultan de reemplazar por glicina cada uno de los aminoácidos de las dos secuencias de referencia. Este principio sugiere la elaboración de una biblioteca de péptidos incorporando los aminoácidos correspondientes según la secuencia, e intercambiando por glicina según sea el caso en cada una de las posiciones, tal como se muestra en la figura 2.

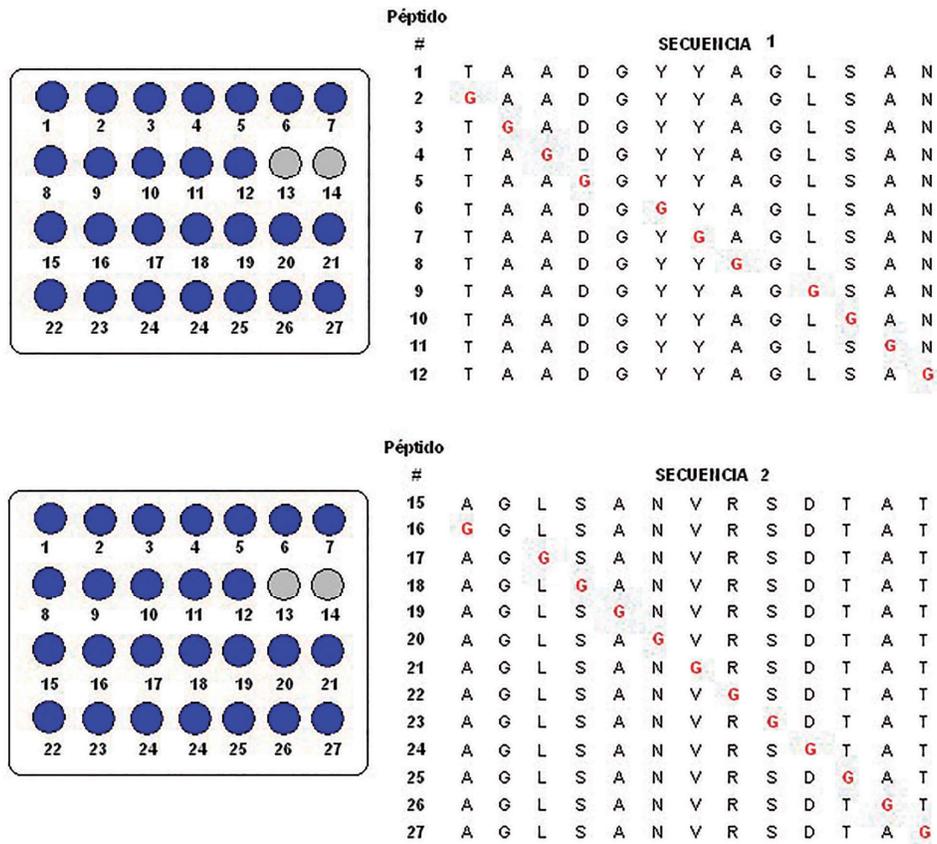


Figura 2. Tamizaje de Gly de las secuencias 1 y 2 del péptido (PT) 50.

Derivatización de la membrana de celulosa

Se trazó con lápiz negro sobre la membrana de celulosa un entramado cuadrangular de líneas con una distancia entre ellas de 10 mm y se enumeró los puntos de intercepción. Posteriormente, la membrana se dejó secar al vacío en una desecadora durante aproximadamente 4 h.

Posteriormente, se colocó la membrana en un recipiente adecuado y se añadió 10 ml de una solución que contenía 0.5 mol/L de Fmoc- β -Ala-OH, 0.5 mol/L de tetrafluoroborato tetrametiluronio (TBTU), 0.5 mol/L de 1 hidroxibenzotrazolio (HOBT) y 1.5 mol/L de N, N' Disopropiletilamina (DIEA) en N, N-dimetilformamida (DMF) y se mantuvo la reacción durante toda la noche a fin de esterificar la Fmoc- β Ala con los grupos hidroxilos de la celulosa en presencia de activadores como el DIEA (Hilpert, Winkler y Hancock, 2007). La reacción que explica el proceso se muestra en la figura 3.

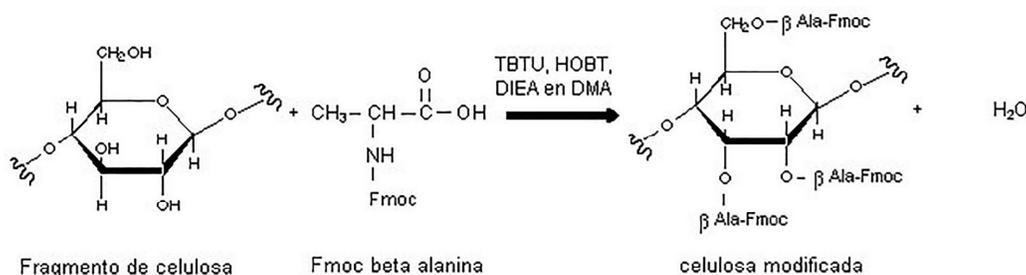


Figura 3. Reacción de esterificación de los grupos hidroxilos con la Fmoc β -Ala.

Durante esta reacción de esterificación el oxígeno presente en el grupo hidroxilo realiza un ataque nucleofílico al carbono del grupo carboxílico. El protón migra al grupo hidroxilo del ácido, que luego es eliminado como agua. El rol de los catalizadores TBTU y HOBT es el de aumentar la actividad carbonílica (la carga parcial positiva sobre el átomo de carbono) por protonación de uno de los oxígenos del ácido.

Posteriormente, se lavó la membrana cuatro veces con DMF por 5 min y se realizó la desprotección o eliminación de los grupos Fmoc de la Fmoc- β -Ala, con la cual se ha funcionalizado la membrana para cada uno de los aminoácidos de la secuencia a sintetizar. Este paso se llevó a cabo adicionando una solución al 20% de piperidina en DMF, dejando en reacción por 20 min, a través de una reacción de β -eliminación, en la que se pierden dos grupos pertenecientes a átomos vecinos, formando doble ligadura. Este procedimiento es de vital importancia para la síntesis, y de su efectividad depende el éxito de acople del siguiente aminoácido en la secuencia peptídica. Se hicieron lavados de la membrana tres veces con DMF por 2 min, diclorometano (DCM) por 2 min y dos veces con metanol por 2 min.

Realizado los lavados, se definió los puntos de síntesis (spots o manchas), con el goteo sobre cada punto marcado con lápiz, de 2 μ l de una solución que contenía 0.5 mol/L de Fmoc- β -Ala-OH, 0.5 mol/L de tetrafluoroborato tetrametiluronio (TBTU), 0.5 mol/L de 1 hidroxibenzotrazolio (HOBT) y 1.5 mol/L de N, N' Diisopropiletilamina (DIEA) en DMF. La finalidad de esta segunda β Ala es actuar como brazo espaciador entre la membrana de celulosa y la secuencia peptídica, tal como se muestra en la figura 4.

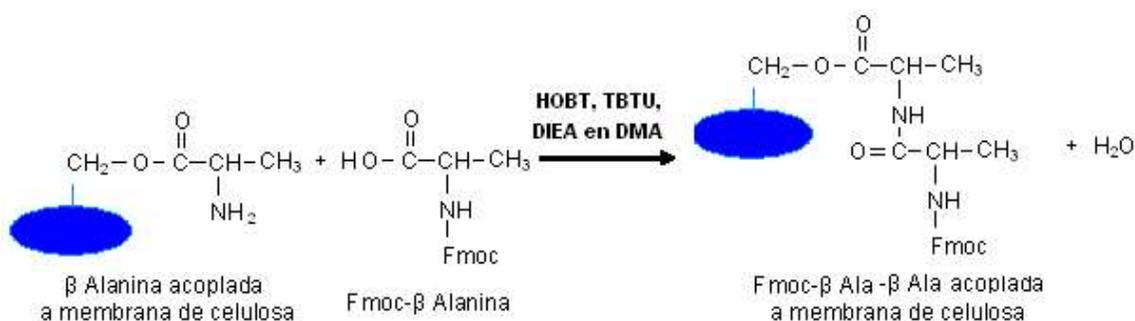


Figura 4. Reacción de acople de la segunda β -Ala a la membrana de celulosa.

Luego se inactiva el resto de los grupos aminos sobre la superficie de la membrana. Para esto se adicionó 10 ml de una solución al 2% de anhídrido acético y 1% de N, N diisopropiletilamina (DIEA) en DMF y se dejó en reacción por 30 min. Se dio la vuelta a la membrana y se repitió este paso por 30 min más. Luego se hicieron lavados con DMF tres veces por 2 min.

Finalmente, se desprotegió el grupo alfa amino del segundo nivel de Fmoc- β -Ala-OH introducido en los puntos demarcados en la membrana. Para eliminar el grupo protector Fmoc del área de las manchas, se siguió el procedimiento descrito anteriormente. Para una mejor visualización del área de las manchas, se implementó un control del paso de desprotección, la membrana se dejó en una solución de 0.1% de azul de bromofenol en DMF. La coloración azul de cada uno de los spots es un control que garantizó que la siguiente reacción de acople puede ser llevada a cabo. En las síntesis convencionales sobre soporte sólido, el control se lleva principalmente sobre la reacción de acople; sin embargo, en la técnica de spot síntesis este paso no se lleva a cabo y en su lugar se determina la viabilidad de continuar o no con el siguiente acople. En la técnica spot síntesis, después de cada acople, en vez de la prueba de ninhidrina usada en la síntesis tradicional para control de acople, se lleva a cabo un paso de acetilación con el fin de eliminar delecciones en el producto final, es decir, se favorece la obtención de secuencias truncadas en vez de dichas delecciones (Sewald y Jakubke, 2002).

Planificación de las reacciones de acoplamiento

Con base en la lista de secuencias de los péptidos que integran la biblioteca (véase figura 2), se calculó las cantidades de aminoácidos protegidos, HOBT y DIC necesarios para cada uno de los acoplamientos.

Ensamblaje de los péptidos

Se inició el acople del primer aminoácido protegido sobre cada una de las manchas teñidas de azul, adicionando 1 μ l de una solución que contenía 0.5 mol/L del éster del HOBT, 0.5 mol/L de TBTU, 0.5 mol/L de Fmoc-aa-OH correspondiente (según la lista de secuencia) y 1.5 mol/L DIEA en DMF. Esta operación se repitió una vez más hasta que la reacción cambió a amarillo la coloración de cada mancha.

Se bloqueó los grupos aminos residuales con 10 ml de una solución al 2% de anhídrido acético en DMF durante 30 s y se repitió esta operación tres veces más por 2 min cada una. Posteriormente, se lavó dos veces con DMF por 2 min y se eliminó el grupo Fmoc- de los grupos aminos del aminoácido acoplado con 10 ml de una solución al 20% de piperidina en DMF y se dejó en reacción por 20 min. Se realizaron lavados de la membrana con DMF y DCM dos veces por 2 min.

Por último, se tiñó los grupos aminos libres en el área de las manchas con una solución al 0.01% de azul bromofenol en DMF por 2 min y posteriormente se hicieron tres lavados con metanol por 2 min. Una coloración azul en cada punto es indicio de una buena desprotección y que la membrana está lista

para el acople del siguiente aminoácido. Se repitieron los pasos anteriores hasta completar la secuencia de los péptidos en las posiciones correspondientes. Al finalizar la síntesis, todos los péptidos fueron acetilados en el extremo N-terminal con una solución al 2% de anhídrido acético y 1% de DIEA en DMF durante 20 min. Luego se lavó la membrana con DCM cuatro veces (4 min), con DMF cinco veces (3 min) y con metanol dos veces (2 min).

Desprotección de las cadenas laterales de los péptidos

Una vez terminada la síntesis en cada uno de los puntos (spots), se retiraron los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman la secuencia de cada uno de los péptidos. Para esto se agregó a la membrana seca 10-15 ml de una solución que contenga 50% de ácido trifluoroacético, 2% de tiofenol, 2% de etanoditiol, 2% de agua y 1% de fenol en diclorometano (DCM), y se dejó en reacción con agitación por 2.5 h a temperatura ambiente. Luego se lavó intensamente con DCM, DMF y metanol por 4, 5 y 2 min, respectivamente. Finalmente, se dejó secar la membrana. El esquema general de síntesis de péptidos por la técnica spot síntesis se muestra en la figura 5.

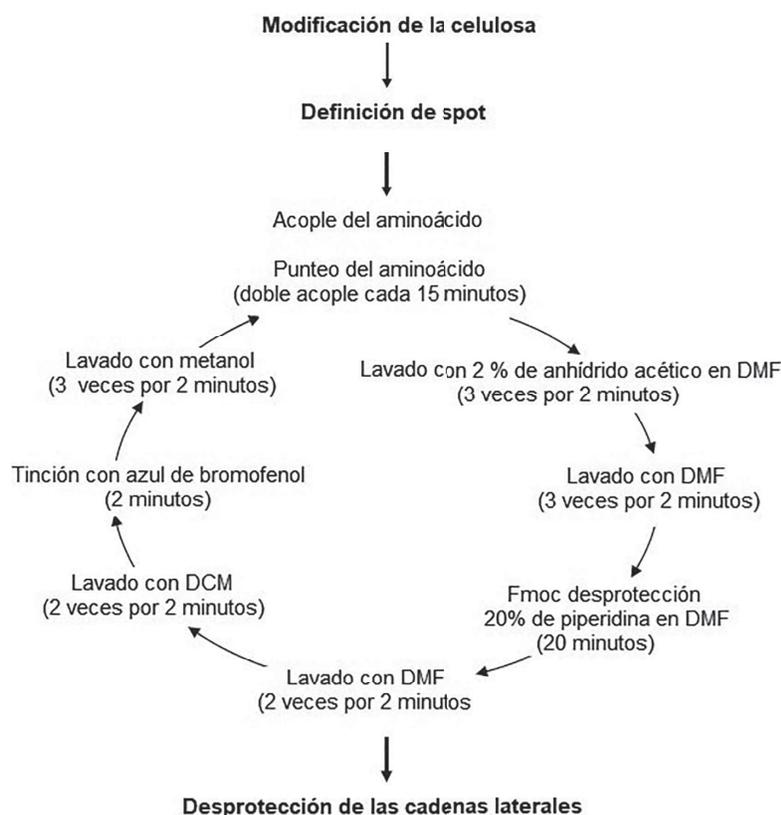


Figura 5. Esbozo de las normas de procedimiento de síntesis spot. Modificación de la celulosa: con la modificación de la superficie de la membrana de celulosa se introduce los grupos aminos necesarios para acceder a las funciones hidroxilo y luego ensamblar las secuencias de aminoácidos (Kramer y Schneider-Mergener, 1998).

Ensayos spot ELISA con sueros policlonales

Se lavó la membrana con etanol para prevenir las interacciones hidrofóbicas entre los péptidos; consecutivamente, se lavó tres veces con una solución de T-TBS (0.05% de Tween-20 en una solución de Tris 10 mmol/L, NaCl 150 mmol/L a pH 7.6), y se bloquearon las interacciones inespecíficas con 10 ml de una solución 5% de leche en TBS (Tris 10 mmol/L, NaCl 150 mmol/L a pH 7.6). Se dejó en reacción con agitación durante toda la noche a temperatura ambiente (Weiser et ál., 2005).

Luego, se incubó durante 3 h a 37 °C con la solución del antisuero humano, diluido 1:200 en leche al 5% en TBS, se añadió el conjugado anti-IgG humano-peroxidasa (1:2000) en solución bloqueadora (5% de leche en TBS) y se mantuvo la reacción durante una hora.

Se revelaron los puntos que reaccionaron con el antisuero humano con 10 ml del sustrato 3.3' diaminobenzidina (DAB) en la solución tampón (Tris 50 mM pH 7.4 y 20 µL de peróxido de hidrógeno 1%) e se incubaron en oscuridad (15-30 min). Las manchas positivas se colorearon de marrón. La reacción de desarrollo de color se detuvo eliminando el sustrato y lavando el papel dos veces con agua destilada. Finalmente, se dejó reposar por 5 min (Dürauer et ál., 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Principales inconvenientes de la técnica spot síntesis

Para la realización de la síntesis se partieron de dos momentos o de dos intentos de acople.

Primer intento de acople

Al momento de realizar la síntesis, el indicador azul de bromofenol en DMF estaba presentando una coloración azul, lo que dio como indicio que el DMF estaba contaminado, debido, posiblemente, a la presencia de grupos aminos libres, que interferían drásticamente con las observaciones hechas hasta el momento para los aminoácidos acoplados a la secuencia peptídica. Además, cabe recordar que el indicador debe presentar una coloración amarilla en presencia de DMF o DMA.

Segundo intento de acople

En vista de los inconvenientes que se dieron en el primer momento, se optó por reiniciar nuevamente la síntesis. La funcionalización de la membrana pasó sin ningún contratiempo. El problema se presentó más adelante, al momento de hacer el primer acople, ya que al realizarse la desprotección con piperidina y el posterior revelado con azul de bromofenol, los puntos de acople no mostraron ninguna coloración, lo que dio como indicio:

- Acetilación completa de todos los spots, impidiendo el ingreso de más aminoácidos a la cadena peptídica.
- Posible presencia de humedad, interfiriendo drásticamente en el acople de cada residuo dentro de la cadena peptídica.

Teniendo en cuenta lo anterior y evaluando lo ocurrido, una explicación acertada a la situación que se presentó se expone a partir del hecho que, posiblemente, los puntos iniciales estaban muy pequeños; por tanto, hay que tener mucho cuidado cuando se adiciona la beta-alanina o alanina,

porque la primera no es de la secuencia. Luego se desprotege todo y se coloca el primer aminoácido procurando que los spots no queden tan pequeños.

Finalmente, se acetila todo el papel y, después de acetilar, se desprotege con piperidina al 20% y se sigue la secuencia.

Ahora, la presencia de humedad en la membrana no puede tomarse como una interferencia en los anclajes, ya que para desanclar un residuo es necesaria la presencia de agentes ácidos; de este modo no se puede asumir que esta sea una explicación a lo ocurrido en la síntesis.

Efectividad de la técnica spot ELISA en la detección de anticuerpos en sueros policlonales

Teniendo en cuenta la posibilidad que ofrece la técnica spot síntesis para realizar ensayos inmunoenzimáticos sobre la membrana de celulosa y determinar si el suero anti-*Leishmania* reconocía los aminoácidos críticos para la reacción antígeno-anticuerpo en dos series de péptidos análogos de las secuencias peptídicas antes descritas, se realizó el ensayo spot ELISA con un suero positivo proporcionado por el laboratorio de parasitología del Instituto Nacional de Salud (código interno 705-415).

Con el fin analizar la reactividad de los aminoácidos críticos presentes en las secuencias peptídicas sintetizadas con el suero positivo, se tuvo en cuenta principalmente los resultados obtenidos con el tratamiento del cromógeno DAB a la serie de péptidos análogos, luego de haber sido tratados en la membrana de celulosa con el suero policlonal y el conjugado anti-IgG-H peroxidasa, obteniéndose los siguientes resultados (véase figura 6).

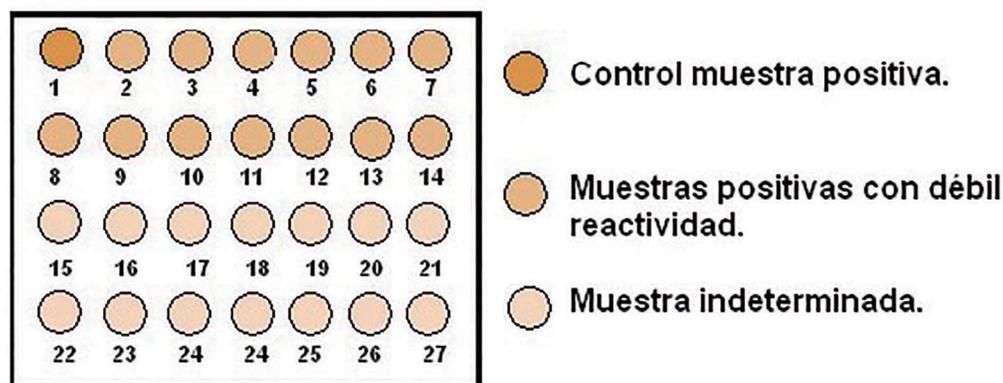


Figura 6. Resultados obtenidos luego de implementar la técnica spot ELISA sobre las secuencias peptídicas y revelar con el cromógeno DAB.

- La secuencia de control 1 (TAADGYAGLSAN) mostró mayor intensidad de color frente al cromógeno DAB en relación con la secuencia de control 2 (AGLSANVRSdTAT), que presentó una coloración marrón demasiado tenue.
- Las series análogas de secuencia 1 (al igual que su control) mostraron mayor coloración frente al revelador en comparación con la serie de análogos de la secuencia 2.

Tabla 1. Reactividad de las secuencias peptídicas frente a un suero policlonal

| N.º DE LA MANCHA | SECUENCIA DEL PÉPTIDO | MUESTRA POSITIVA | MUESTRA POSITIVA CON DÉBIL REACTIVIDAD | MUESTRA INDETERMINADA |
|------------------|-----------------------|------------------|--|-----------------------|
| 1 (control) | TAADGYYAGLSAN | X | | |
| 2 | GAADGYYAGLSAN | | X | |
| 3 | TGADGYYAGLSAN | | X | |
| 4 | TAGDGYAGLSAN | | X | |
| 5 | TAAGGYYAGLSAN | | X | |
| 6 | TAADGGYAGLSAN | | X | |
| 7 | TAADGYGAGLSAN | | X | |
| 8 | TAADGYYGGLSAN | | X | |
| 9 | TAADGYYAGGSAN | | X | |
| 10 | TAADGYYAGLGAN | | X | |
| 11 | TAADGYYAGLSGN | | X | |
| 12 | TAADGYYAGLSAG | | X | |
| 15 (control) | AGLSANVRSDTAT | | X | |
| 16 | GGLSANVRSDTAT | | | X |
| 17 | AGGSANVRSDTAT | | | X |
| 18 | AGLGANVRSDTAT | | | X |
| 19 | AGLSGNVRSDTAT | | | X |
| 20 | AGLSAGVRSDTAT | | | X |
| 21 | AGLSANGRSDTAT | | | X |
| 22 | AGLSANVGSDTAT | | | X |
| 23 | AGLSANVRGDTAT | | | X |
| 24 | AGLSANVRSGTAT | | | X |
| 25 | AGLSANVRSDGAT | | | X |
| 26 | AGLSANVRSDTGT | | | X |
| 27 | AGLSANVRSDTAG | | | X |

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 1, se puede decir que la mayoría de los anticuerpos en el suero policlonal reconocen principalmente los aminoácidos presentes en la secuencia 1, lo cual se evidencia en el comportamiento que presentaron los spots al momento de entrar en contacto con el revelador cromogénico DAB. Sin embargo, aunque los cambios con glicina (Gly) disminuyen la intensidad, no es posible identificar en las secuencias peptídicas la presencia de aminoácidos críticos en el reconocimiento de anticuerpos. Esto parece indicar que la mayoría de los anticuerpos presentes estarían dirigidos hacia los trece primeros residuos de la secuencia (PT) 50, siendo esta una secuencia clave para analizar más adelante los posibles aminoácidos críticos presentes con anticuerpos monoclonales.

Finalmente, se puede decir que la baja intensidad de coloración marrón en los spot al momento de realizar el spot ELISA puede deberse a que en los pasos posteriores al acople de cada aminoácido se llevó a cabo una acetilación, en la que se truncaba aquellas cadenas que no habían reaccionado con el aminoácido que se estaba acoplado, lo cual disminuía la población de las cadenas peptídicas en

cada spot y la reactividad de los péptidos con los anticuerpos presentes en el suero (Beutling, Ståding, Stradal y Frank, 2008).

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos durante la síntesis de péptidos implementando la técnica spot síntesis, se puede concluir que:

La técnica spot síntesis posibilita la síntesis de péptidos de forma masiva para pruebas piloto, en las que se puede predecir de manera momentánea y a bajo costo el comportamiento de las secuencias peptídicas sintetizadas, al momento de hacer ensayos inmunoenzimáticos sobre la membrana de celulosa, además de que se puede reutilizar y conservar para ensayos posteriores.

En lo respecta a la técnica spot ELISA, es importante aclarar que esta técnica permite analizar la reactividad de los péptidos sintetizados, mas no permite hacer una clara distinción entre los aminoácidos críticos presentes en las secuencias si estas son tratadas con sueros policlonales. Por tanto, sería importante respaldar la técnica con otros inmunoensayos capaces de identificar los aminoácidos de interés sobre bibliotecas de péptidos.

Es conveniente verificar la efectividad de las técnicas utilizando dos o más bibliotecas de péptidos con las mismas series peptídicas, para tener un punto de comparación entre una y otra membrana, y de este modo tener una mayor precisión en los resultados.

Por último, sería conveniente evaluar la efectividad de la síntesis peptídica, acompañando la técnica con otros métodos de caracterización cuantitativa, que posibilite un análisis estadístico y una mejor descripción de las secuencias sintetizadas.

Referencias

- Beutling, U., Ståding, K., Stradal, T., y Frank, R. (2008). Large-scale analysis of protein-protein interactions using cellulose-bound peptide arrays. En M. Werther y H. Seitz (Eds.), *Protein-protein interaction* (pp. 115-152). Berlín: Springer.
- Díaz, R. (2006). *Análisis de las características estructurales y antigénicas de péptidos correspondientes a tres fragmentos de la proteína gp63 del género Leishmania* (trabajo de grado). Licenciatura en Biología, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá D. C., Colombia.
- Dürauer, A., Kopecky, E., Berger, E., Seifert, M., Hahn, R., y Jungbauer, A. (2006). Evaluation of a sensitive detection method for peptide arrays prepared by spot synthesis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 66(1-3), 45-57. doi: 10.1016/j.jbbm.2005.11.002
- Espanela, X., y van Huijsduijnen, R. (2004). Applying the spot peptide synthesis procedure to the study of protein tyrosine phosphatase substrate specificity: probing for the heavenly match in vitro. *Methods*, 35(1), 64-72. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.07.009
- Frank, R. (2002). The spot-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports-principles and applications. *Journal of Immunological Methods*, 267(1), 13-26. doi: 10.1016/S0022-1759(02)00137-0
- Gutte, B., y Merrifield, R. (1971). The synthesis of ribonuclease A. *The Journal of Biological Chemistry*, 246(6), 1922-1941.
- Hilpert, K., Winkler, D., y Hancock, R. (2007). Peptide arrays on cellulose support: spot synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. *Nature Protocols*, 2(6), 1333-1349.

- Kramer, A., y Schneider-Mergener, J. (1998). Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports. En S. Cabilly (Ed.), *Methods in molecular biology* (pp. 25-39). EE.UU.: Humana Press Inc.
- Laune, D., Molina, F., Ferrieres, G., Villard, S., Bes, C., Rieunier, F., Chardès, T., Granier, C. (2002). Application of the spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *Journal of Immunological Methods*, 267(1), 53-70. doi: 10.1016/S0022-1759(02)00140-0
- Lien, S, y Lowman, H. (2003). Therapeutic peptides. *Trends in Biotechnology*, 21(12), 556-562. doi: 10.1016/j.tibtech.2003.10.005
- Merrifield, B. (1964). Solid phase peptide synthesis. II. The synthesis of bradykinin. *Journal of the American Chemical Society*, 86(2), 304-305.
- Reineke, U., Sabat, R., Volk, H., y Schneider-Mergener, J. (1998). Mapping of the interleukin-10/interleukin-10 receptor combining site. *Protein Science*, 7(4), 951-960. doi: doi.org/10.1002/pro.5560070412
- Sewald, N., y Jakubke, H. (2002). Peptides: chemistry and biology. Alemania: Wiley-VCH.
- Whatman. (s.f.). Filtration simplified. Recuperado de <http://www.whatman.com/References/FiltrationSimplified.pdf>