

24
234



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**PURIFICACION DE TOXINA TETANICA POR EL USO
DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

JORGE MATEO VILLASECA FLORES

**TESIS CON
SEALA DE ORIGEN**

México, D.F. 1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
HIPOTESIS	9
OBJETIVO	9
MATERIAL Y METODOS	10
RESULTADOS	24
DISCUSION Y CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFIA	44
LISTA DE FIGURAS	
Figura No 1	30
Figura No 2	31
Figura No 3	32
Figura No 4	27
Figura No 5	28
Figura No 6	33
Figura No 7	36
Figura No 8	39
Figura No 9 a y 9 b	06
LISTA DE CUADROS	
Cuadro No 1	34
Cuadro No 2	35
Cuadro No 3	26
Cuadro No 4	29
Cuadro No 5	37
Cuadro No 6	38

RESUMEN

La posibilidad de purificar la toxina tetánica a nivel industrial, permitirá la obtención de un toxoide puro para la inmunización de humanos sin las reacciones adversas observadas con el uso de toxoides no puros. Teóricamente se tendrán respuestas inmunes mejores, por lo que el proceso de obtención de anticuerpos homólogos o heterólogos para la seroterapia de humanos se verá favorecida notablemente.

En este trabajo se informan los resultados de la purificación de la toxina tetánica inicialmente por métodos bioquímicos y posteriormente por medio de la cromatografía de afinidad.

La obtención de toxina tetánica a partir de los cuerpos bacterianos facilitó la purificación de la misma tanto por métodos bioquímicos como por cromatografía de afinidad, logrando obtener productos que muestran solamente dos bandas en geles de acrilamida-SDS; sin embargo el rendimiento obtenido es superior en un orden mayor de diez veces usando el segundo método, cuando se parte de la toxina intracelular y con una diferencia mayor de 20 veces cuando se trabaja con la toxina extracelular; sin embargo la diferencia mas importante

entre estos dos métodos de purificación es sin lugar a dudas el hecho de que el proceso bioquímico resulta demasiado elaborado lo que imposibilita su implementación a nivel industrial, en cambio la cromatografía de afinidad se realiza en un solo paso por lo que escalar el nivel industrial resulta fácilmente visible.

INTRODUCCION

El tétanos es una enfermedad infecciosa que constituye un problema de Salud Pública en algunos países en vías de desarrollo. Anualmente se calcula que produce alrededor de un millón de muertes en el mundo; en México la mortalidad por tétanos se calcula en aproximadamente 2,000 personas por año, de las cuales el 61 % corresponde a recién nacidos (10).

En la actualidad, la existencia de una vacuna eficiente, y los cambios de conducta en la atención del parto en los países industrializados dan como consecuencia la eliminación del problema sin embargo en los países en vías de desarrollo el no mantener una cobertura amplia o total de vacunación en las personas expuestas a padecer la enfermedad, y la atención rudimentaria de los partos, explica porqué la enfermedad sigue siendo endémica en estos lugares y la relación directa entre factores ecológicos y socioeconómicos y la enfermedad, explica porqué la morbilidad es mas alta en Africa, Asia y Latinoamérica comparativamentea Europa y Norteamérica (1,2)

El agente etiológico del tétanos es el Clostridium tetani, el cual habitualmente llega al organismo en forma esporulada. Por ser un bacilo anaerobio necesita para su desarrollo ciertas condiciones ambientales las cuales casi siempre son dadas por un proceso bacteriano

piógeno secundario ó bien por la presencia de tejido necrótico. Estos eventos crean un potencial de oxido reducción bajo, propicio para el desarrollo de Cl. tetani. Es necesario puntualizar que no es una bacteria invasiva, sino que su mecanismo de patogenicidad principal está dado por la síntesis de una neurotoxina que se une específicamente a un receptor, probablemente un disialogangliósido llamado G III, que se encuentra en la membrana presináptica de las terminales inhibitorias de las motoneuronas espinales (3). Al efectuarse la unión entre la toxina y el receptor, se altera la liberación y/o producción del neurotransmisor (probablemente glicina) de las terminales inhibitorias, impidiéndose el paso de los impulsos que regulan la actividad de las motoneuronas (4).

La toxina tiene un efecto periférico sobre los músculos con inervación parasimpática colinérgica y en los músculos esqueléticos bloquea la transmisión neuromuscular e interfiere con el mecanismo de relajación. La toxina tetánica se absorbe de los sitios donde se desarrolla la bacteria y a partir de la unión neuromuscular se transporta centripetamente por los axones hasta las neuronas inhibitorias. Es factible que la muerte por tétanos tenga una causa multifactorial dado que se ha descrito una elevación a nivel sérico de enzimas musculares como la creatinfosfocinasa, la deshidrogenasa láctica y la deshidrogenasa alfa-hidroxi-

butírica, pero muchas de las muertes se reportan como paros respiratorios o cardiorespiratorios (22).

Como se mencionó anteriormente, el principal mecanismo de patogenicidad esta constituido por esta neurotoxina, la cual es una molécula proteica con peso molecular aproximado de 150,000 daltones. Existen varios modelos estructurales de la misma, entre los mas conocidos está el de Bizzini y col. los que consideran a la molécula compuesta por dos subunidades mantenidas juntas por uniones no covalentes. Cada subunidad o monómero está formado por dos cadenas polipeptídicas, una mayor con peso molecular de 52,000 y una menor o ligera con peso de 21,000 daltones, las cuales se encuentran unidas entre sí por puentes disulfuro (5) Figura 9 a.

El otro modelo, propuesto por Matsuda y Yoneda, señala que la toxina está formada solamente por dos cadenas polipeptídicas de 107,000 y 53,000 daltones respectivamente, unidas por puentes disulfuro (6).

En 1975 estos autores encontraron que la toxina es elaborada por la bacteria como una sola cadena y hasta el momento en que es secretada, por acción de una enzima proteolítica del Clostridium, se convierte a la forma extracelular de doble cadena (6). Es probable también, que la hidrólisis se lleve a cabo en el medio de cultivo por proteasas extracelulares (7) Figura 9 b.

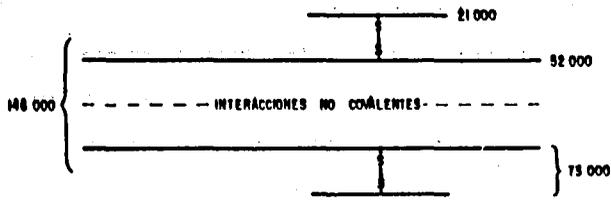


Fig. 9a MODELO PROPUESTO POR BIZZINI

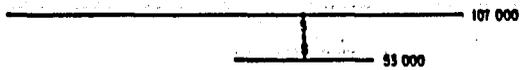


Fig. 9b MODELO PROPUESTO POR MATSUDA

Figuras 9a y 9b Modelos estructurales de toxina tetánica

Habitualmente la toxina se obtiene de los cultivos después de haber permitido el crecimiento bacteriano, manteniendo estos a 4°C durante cinco días para permitir que se lleve a cabo la lisis bacteriana y se libere la toxina, eliminando los detritus celulares por filtración o centrifugación. En solución la toxina es muy inestable por lo que se debe guardar en frío y protegida de la luz; en forma liofilizada conserva su actividad durante varios años (5). La toxina tetánica es uno de los venenos más potentes que se conocen, su toxicidad excede con mucho a la de los alcaloides y otras sustancias que suelen considerarse altamente venenosas, las preparaciones cristalinas contienen de 5 a 7.5×10^7 dosis letales para el ratón por mg de nitrógeno (8).

En 1890 Von Behring y Kitasato demostraron que la toxina tetánica modificada con tricloruro de iodo perdía su toxicidad, haciendo posible su utilización para la inmunización de animales; en 1917 Vallé y Bazy durante la primera guerra mundial utilizaron este producto en humanos, sin embargo en 1923 Ramón descubre que la toxina tetánica expuesta a la acción de ciertas concentraciones de formaldehído pierde su capacidad tóxica conservando su poder inmunogénico, obviamente esto elimina los problemas de toxicidad de los productos iodados por lo que este producto llamado toxoide comienza a utilizarse para la vacunación en humanos (9).

A partir de los años cincuentas los filtrados crudos de toxina tetánica detoxificada por la acción del formaldehído se usó para la inmunización masiva en humanos, nuestro país fué uno de los pioneros en el uso de este toxoide y su producción y aplicación con coberturas amplias se inició en 1953, vacunándose en los siguientes 20 años mas de 62 millones de personas, sin contemplar las dosis aplicadas en personas con esquemas de vacunación incompletos (10).

En la actualidad, con la finalidad de eliminar los efectos secundarios indeseables del toxoide tetánico, e incrementar la respuesta inmune, se utiliza para la inmunización de humanos preparaciones semipurificadas (23,24), sin embargo en nuestro país la tecnología no ha sido modificada sustancialmente de manera que todavía se utiliza el filtrado crudo obtenido del cultivo del Clostridium tetani unicamente precipitado con sulfato de amonio, lo cual si bien concentra el toxoide, no elimina casi ninguno de los contaminantes de la preparación original, donde se encuentran otras proteínas bacterianas y contaminantes del medio de cultivo.

HIPOTESIS

Bajo la hipótesis de que los anticuerpos específicos anti toxina tetánica, permitirán la detección y separación de la molécula, a partir de una mezcla de distintos componentes en una preparación cruda o semicruda, se plantea el objetivo siguiente:

OBJETIVO

El objetivo primordial de este trabajo es el diseño de un metodo de purificación de la toxina tetánica que resulte factible de implementar a nivel industrial.

MATERIAL Y METODOS

Inicialmente se cultivó la bacteria siguiendo el método tradicional de cultivo estacionario en garrafón, aunque se contó con la posibilidad de obtener toxina tetánica de un cultivo en un fermentador con motovibración. Ambos métodos permiten, si se permite el crecimiento bacteriano por mas de 7 días, obtener toxina extracelular; sin embargo si el cultivo se detiene a los 3-4 días, de las bacterias se puede obtener la toxina intracelular.

Ambas toxinas: la extracelular obtenida de cultivos viejos, y la intracelular obtenida por el método descrito por Bizzini y Raynaud (11), fueron purificadas por el método descrito por Barbosa (12). La toxina con mayor grado de purificación fué utilizada para inmunizar conejos y obtener anticuerpos específicos, estos anticuerpos fueron ligados covalentemente a Sepharosa-6B y de esta manera se procedió a purificar la toxina a partir del medio de cultivo ó de un extracto crudo de toxina intracelular.

Cultivo de la bacteria.

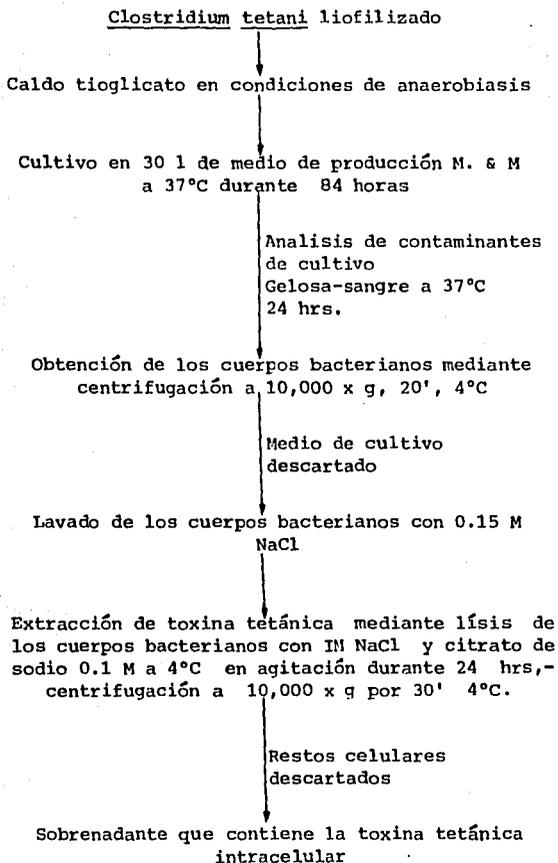
La cepa de Clostridium tetani Harvard nr 49205 Y-IV-VIII fué obtenida en forma liofilizada del cepario del Instituto Nacional de Higiene de la Secretaría de Salud. La bacteria fué sembrada en tubos para cultivo con tapas de rosca conteniendo cada uno 50 ml de medio de

tioglicolato (Merck 15867) estéril, e incubándolos en una jarra de anaerobiosis (GasPak System), durante 24 horas a 37°C, pasado el tiempo se propagó la semilla en nuevos tubos con medio de tioglicolato. Posteriormente la bacteria se adaptó al medio de cultivo de Mueller & Miller (10) cultivándola en tubos bajo las mismas condiciones para proceder posteriormente a crecerla en garrafones con 15 litros de medio cada uno 37°C durante 84 horas, al cabo de los cuales se procedió a centrifugar a 10,000 x g a 4°C durante 20 minutos en una ultracentrífuga Kontron modelo TGA-75.

Extracción de la toxina intracelular.

Las bacterias aisladas, se lavaron con una solución isotónica estéril de cloruro de sodio para eliminar el medio de cultivo, nuevamente se centrifugaron bajo las condiciones descritas vide supra. El paquete celular fué resuspendido en una solución hipertónica de cloruro de sodio 1 M-citrato de sodio 0.1 M donde se dejaron 24 hs a 4°C en agitación lenta. Se centrifugó a 10,000 x g a 4°C durante 30 minutos para eliminar los detritus celulares, y obtener de esta manera la toxina intracelular ver diagrama de flujo siguiente.

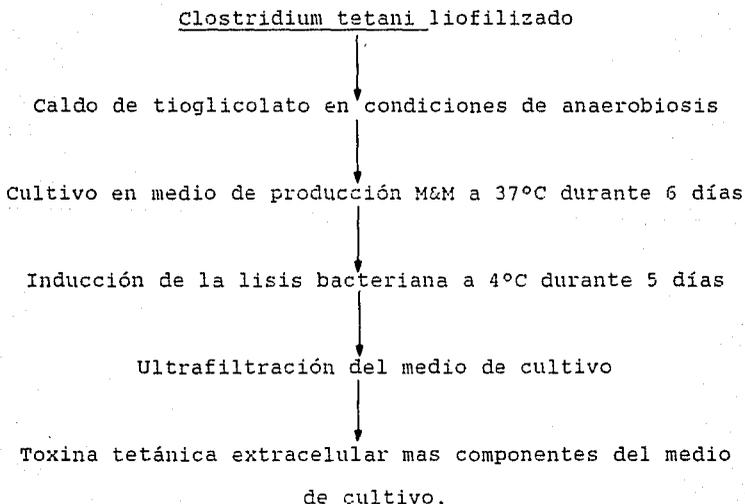
OBTENCION DE TOXINA TETANICA INTRACELULAR



Obtención de la toxina extracelular.

La toxina extracelular fue obtenida del fermentador Paljas del Instituto Nacional de Higiene, la bacteria se cultivo durante 6 días, después de lo cual el medio de cultivo con las bacterias fué colocado en garrafones estériles en volúmenes aproximados de 15 litros y colocado durante 5 días a 4°C para permitir la lisis total de las bacterias. Los restos celulares fueron eliminados por filtración del medio en un equipo de ultrafiltración Millipore, de acuerdo al diagrama siguiente.

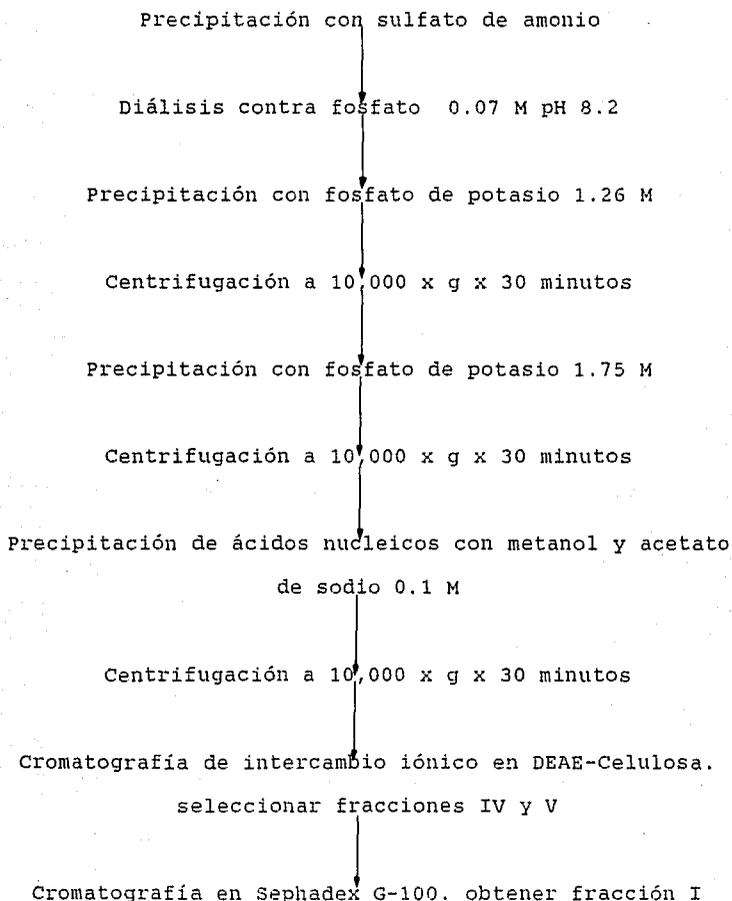
OBTENCION DE TOXINA EXTRACELULAR



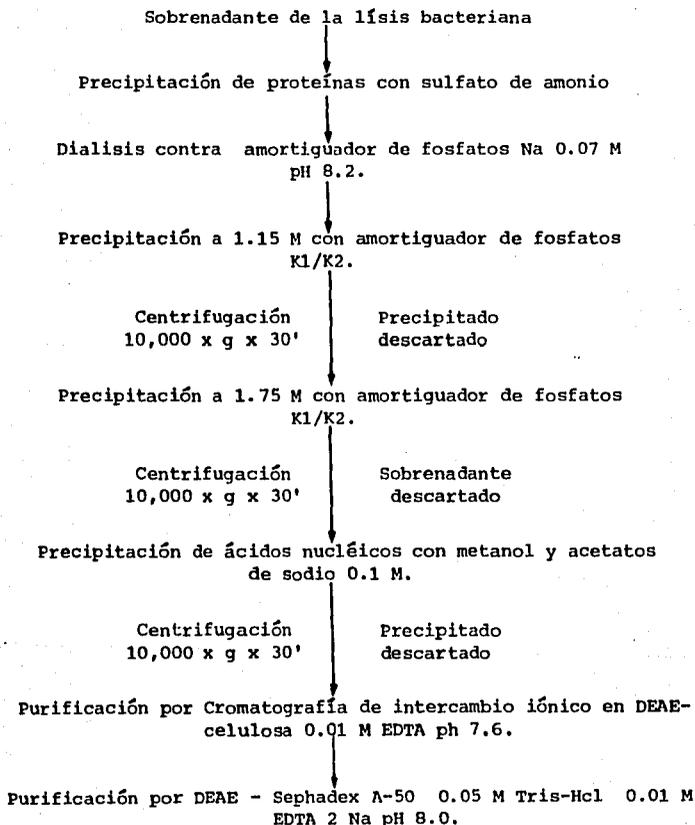
El método bioquímico de purificación utilizado fué como se mencionó el descrito por Barbosa, el cual brevemente consiste en: precipitación de las proteínas con el sistema de "salting out", utilizanddo sulfato de amonio a una concentración de 75 %, el precipitado se resuspendió y dializó contra un amortiguador de fosfatos de sodio 0.07 M pH 8.2 hasta eliminar por completo el sulfato de amonio. En seguida se realizó una precipitación selectiva dializando contra un amortiguador de fosfato de potasio 3.5 M pH 6.8 hasta alcanzar una molaridad de 1.15 y se centrifugó a 10,000 x g a 4°C durante 30 minutos, el precipitado se eliminó y el sobrenadante se dializó nuevamente contra el mismo amortiguador para lograr una molaridad de 1.75, se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones; el tiempo de diálisis fué de 24 h en cada uno de los pasos, y el precipitado se resuspendió durante 36 h a -5°C en una solución de metanol al 7.5 % y acetato de sodio 0.1 M para precipitar los ácidos nucleicos, los cuales se eliminaron por centrifugación en las mismas condiciones. Finalmente realizar dos cromatografías en columna, la primera de intercambio iónico en DEAE celulosa utilizando una solución de EDTA 0.01 M pH 7.6 y la segunda de filtración e intercambio iónico en DEAE Sephadex A-50 usando una solución de Tris HCl 0.05 M EDTA 0.01 M pH 8.0. Las diferencias en los métodos usados para la purificación de las toxinas intra y extracelular fueron: la molaridad del sulfato de amonio,

la molaridad del amortiguador de fosfato de potasio, el uso de Sephadex G-100 grueso (Pharmacia Fine Chem) en el caso de la toxina extracelular y el uso de DEAE Sephadex A-50 en el caso de la toxina intracelular, de acuerdo a los siguiente esquemas:

PURIFICACION DE TOXINA TETANICA EXTRACELULAR



PROCESOS DE PURIFICACION DE TOXINA TETANICA INTRACELULAR



Detoxificación.

Del volúmen obtenido de la cromatografía en DEAE-Sephadex A-50 (45 ml) se separaron 11 ml y al remanente en Tris 0.05 M EDTA 0.01 M pH 8.0 se le añadieron 0.136 ml de formaldehido (Sigma No.197) y se incubó en reposo durante 23 días a 37°C. El mismo método fué utilizado tanto para la toxina intracelular como para la extracelular, guardando siempre la misma proporción de 4 ml de formaldehido por litro de toxina. El volúmen obtenido de toxina extracelular fué de 13 ml los cuales fueron detoxificados en su totalidad. Los toxoides obtenidos después de incubar las toxinas con el formaldehido, fueron probados en cuanto a su inocuidad, inyectando 100 DMM en 7 ratones CD1 de 18-20 g de peso, y vigilados durante 10 días.

Inmunización y Obtención de Inmunoglobulinas.

Los toxoides obtenidos, se utilizaron para inmunizar dos conejos de acuerdo a los esquemas descritos en los Cuadros no. 1 y 2 en los que destaca principalmente el hecho de que los dos primeros estímulos antigénicos se dieron mezclados volúmen a volúmen con Adyuvante Completo de Freund y se administraron por vía subcutánea en varios sitios del dorso y en el cojinete plantar; los siguientes estímulos fueron administrados por vía intramuscular. Los conejos fueron sangrados después del 4° estímulo antigénico y después de cada nueva

estimulación para cuantificar la producción de anticuerpos, lo cual se realizó por la prueba de Doble inmunodifusión (DID), cuando se lograron títulos arriba de 1:32, se obtuvieron 15 ml de sangre de cada conejo, se separó el suero y se precipitaron las inmunoglobulinas adicionando una solución saturada de sulfato de amonio pH 7.4, hasta lograr una concentración final de 33%. Las precipitaciones se repiten hasta lograr eliminar la hemoglobina después de lo cual el producto se dializó contra PBS pH 7.2 para eliminar el sulfato de amonio y finalmente se dializó contra una solución de fosfato de sodio 0.01 M pH 8.0. Posteriormente se purificaron las inmunoglobulinas utilizando una columna de DEAE-Celulosa de 1.4 cm de diámetro, 75 cm de altura, volúmen total de 115 ml y velocidad de flujo de 40 ml/h. Se utilizaron 9 ml de la muestra conteniendo 171 mg de Igs. Después de la cromatografía, se obtuvieron 52.8 mg de proteína, las cuales se concentraron en una celdilla de ultrafiltración (Amicon modelo A 50) con una membrana YM 5 con una capacidad de retención de moléculas mayores a los 5 000 daltones, al volúmen final (10) ml se le determinó la concentración total de proteína (42 mg) utilizando el método de Lowry (13).

Dobleinmuncodifusión.

La reactividad de los sueros obtenidos de los conejos inmunizados fué probada mediante la técnica de Ouchterlony (14), usando agar al 1 % en solución salina isotónica amortiguada con fosfato de sodio 0.01 M pH 7.4 (PBS).

Acoplamiento de las Inmunoglobulinas a Sefarosa 6B.

Las inmunoglobulinas fueron unidas covalentemente a Sefarosa-6B (Sepharose 6B Pharmacia Fine Chem) de acuerdo a la técnica descrita por Cuatrecasas (15), la cual consiste sucintamente en activar la sefarosa colocándola en una solución de carbonato de sodio 2 M pH 11, agitando con suavidad durante 3 minutos, después de lo cual se agregó bromuro de cianuro en acetonitrilo agitando fuertemente dos minutos y después de filtrar para eliminar el acetonitrilo se lavó con 10 volúmenes de bicarbonato de sodio 0.1 M pH 9.5, igual volumen de agua desionizada y finalmente un volumen igual de bicarbonato de sodio 0.2 M pH 9.5 agregando las inmunoglobulinas en el mismo amortiguador, donde se mantuvieron durante 20 h a 4°C. Finalmente se lavó con PBS pH 7.4 y se inactivaron los sitios activos libres con una solución de glicina 0.2 M en PBS pH 7.4 incubando durante 20 h, se lavó con PBS hasta tener una lectura del lavado de cero a una longitud de onda de 280 nm.

Purificación de toxina tetánica por Cromatografía de afinidad.

Diez mililitros de sefarosa 6B-IgG antitetánica, se incubaron con 4 ml de toxina tetánica cruda extracelular a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se filtró en un embudo buchner por medio de vacío y se lavó con PBS pH 7.4 hasta que la solución de lavado mostró una

densidad óptica de cero a una longitud de onda de 280 nm. La toxina unida a la sefarosa-IgG se desprendió utilizando una solución de glicina HCl 0.2M pH 2.2. Se agitó brevemente y se filtró para obtener la toxina en 4 ml de una solución de fosfato de potasio dibásico 2M, con la finalidad de neutralizar inmediatamente el pH ácido utilizado para alterar la unión toxina-antitoxina. La sefarosa-IgG se lavó inmediatamente con 20 volúmenes de PBS. La toxina purificada de esta manera se concentró en una celdilla de ultrafiltración Amicon modelo A-10 utilizando una membrana YM 5 y se dializó en el mismo sistema para tenerla en una solución de Tris 0.05M EDTA 0.01M pH 7.6, llevándose a un volúmen de 1 ml para posteriormente concentrarla a 50 ul colocándola en un tubo de diálisis de 1 cm de diámetro en contacto con glicerol para eliminar agua.

La pureza de la toxina obtenida de la manera anteriormente descrita, fué probada en una electroforesis utilizando un gel de acrilamida al 10% según el método descrito por Laemmli (16). La tinción del gel se realizó con nitrato de plata (17). La columna de afinidad fué lavada con 20 volúmenes de PBS pH 7.2 para procesar otras muestras de toxina tetánica y el producto obtenido se utilizó para cuantificar la dosis mínima mortal.

La toxina intracelular (5.5 mg) en 10 ml de PBS se incubó en los 10 ml de Sefarosa-IgG antitetánica durante dos horas a 37° C con agitación suave, posteriormente se filtró en papel filtro Whatman No 4 colectándose el eluido el cual se guardó a 4°C. La columna se lavó con 100 volúmenes de PBS pH 7.4. Inmediatamente a los 10 ml de Sefarosa se les agregó 5 volúmenes de glicina 0.2M pH 2.2 recibiendo este eluido en 20 ml de fofato de potasio 2M . La Sefarosa se lavó nuevamente con 100 volúmenes de PBS para guardarla a 4° C. El producto obtenido fué concentrado en una celdilla Amicon A 50 usando una membrana YM 100 dializando al mismo tiempo con una solución de Tris Base 0.05M EDTA 0.01 M pH 7.6 hasta tener un volúmen de 1.8 ml. Se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Lowry y se analizó la pureza utilizando el sistema de electroforesis en geles de acrilamida y cuantificando la actividad específica.

Regeneración de la columna de Sepharosa.

Para lograr la mejor funcionalidad de la cromatografía de afinidad, antes de reusar la columna, se procedió a lavarla con 10 volúmenes de una solución de Tris-HCl 0.1M pH 8.5 en 0.5M de NaCl, posteriormente se lavó con 10 volúmenes de amortiguador de acetato de sodio 0.1M pH 4.5 en 0.5 de NaCl, enseguida con 10 volúmenes de Tris-HCl 0.01M pH 7.5 en 0.15M de NaCl-Nonidet P-40 al 2% y finalmente se lavó con 10 volúmenes de PBS pH 7.4(18) .

Determinación de Dosis Mínima Mortal.

La actividad de la toxina tetánica fué cuantificada utilizando ratones CD1 de 18-20 gr. Se hicieron diluciones seriadas de la toxina en proteasa peptona al 1% en salina isotónica; 0.5 ml de cada dilución fué inyectada por via intramuscular en la pata trasera de cada uno de un grupo de 6 animales, se vigilaron estrechamente durante cinco días para tener datos sobre la presencia de tétanos localizado y registrar el número de muertos. El cálculo final se refiere como la última dilución capaz de matar a los animales multiplicada por un factor dado por el tiempo en el que se registra la muerte del animal (19).

Capacidad de Neutralización de la antitoxina.

La capacidad de la antitoxina para neutralizar la actividad de la toxina fué ensayada usando el mismo modelo biológico del ratón. Para ello diluciones 1:2, 1:3 y 1:4.5 de la antitoxina fueron incubadas a temperatura ambiente durante una hora con una cantidad conocida de toxina tetánica y posteriormente 0.5 ml de cada mezcla fué inyectada a cada uno de 5 ratones Taconi de 18-20 g de peso. Fueron vigilados durante cinco días para registrar el número de muertos y determinar de esta manera la capacidad de las inmunoglobulinas para neutralizar la toxina comparativamente a los grupos testigos inyectados uno de ellos con 178 DMM de toxina y otro grupo con el antisuero diluído 1:2.

RESULTADOS

Clostridium tetani creció sin ningún problema en los medios de cultivo utilizados, el crecimiento bacteriano fué atestiguado por la tinción de frotis donde se observaron las formas clásicas del bacilo, no hubo crecimiento de contaminantes en las muestras tomadas y sembradas en agar sangre. Los datos de la obtención y purificación por métodos bioquímicos de la toxina tetánica intracelular, se encuentran concentrados en el cuadro No 3, donde se puede observar que el rendimiento logrado con este método de purificación es de 0.26% y los perfiles de las cromatografías se encuentran en las figuras 4 y 5. Igualmente se trabajó para la purificación de la toxina extracelular y los datos se pueden observar en el cuadro No 4 y las figuras 1 y 2, donde se muestra que con la metodología utilizada, se logran distintos grados de purificación en cada muestra de acuerdo a los resultados de las electroforesis mostradas en las figuras 3 y 6.

En los Cuadros Número 1 y 2, y en la Figura 7 se pueden observar los resultados de la inmunización de los conejos.

En los Cuadros No. 5 y 6 y la Figura 8 se pueden observar los resultados de la cromatografía de afinidad, tanto para la toxina intra como extracelular. Con esta metodología se logró una eficiencia superior al método

bioquímico en cuanto a rendimiento, dado que para el caso de la toxina intracelular se logra tener un 3.8 % de la proteína inicial, mientras que para la extracelular se logra el 0.34%.

Cuadro 3
PURIFICACION DE TOXINA INTRACELULAR

	Volumen ml	Conc. Prot. mg/ml	Prot. Tot. mg	Proteína %	D.M.M. /ml.	D.M.M. Total	Act. Esp. /mg. Prot	D.M.M. %
Sobrenadante de lisis bacteriana	1620	1.253	2029.86	100	3.48×10^5	5.67×10^8	2.77×10^5	100%
Sobrenadante sulfato de amonio	33	4.372	144.3	7.1	3.6×10^3	1.188×10^5	8.234×10^2	2.095×10^{-2}
Precipitado de sulfato de amonio	230	5.44	1251.2	61.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Sobrenadante fosfatos 1.15 M	130	8.56	1112.8	54.82	4×10^6	5.2×10^8	4.673×10^5	9.17
Precipitado fosfatos 1.15 M	5	3.037	15.185	0.748	1.96×10^3	9.8×10^3	6×10^2	1.728×10^{-3}
Sobrenadante fosfato 1.75 M	91	9.514	865.774	42.65	1.6×10^6	2.366×10^8	2.733×10^5	4.172
Precipitado fosfatos 1.75	50	2.9103	145.515	7.168	MD.	N.D.	N.D.	N.D.
Sobrenadante con metanol y acetatos.	48	0.165	29.52	1.454	4×10^6	1.92×10^8	6.5×10^6	3.38
Precipitado con metanol y acetatos.	30	2.463	73.89	3.64	2.2×10^6	0.66×10^8	8.93×10^5	1.164
Elución columna DEAE-celulosa	10	0.866	8.66	0.426	1.76×10^7	1.76×10^8	2.032×10^7	3.104
Elución columna DEAE-sephadex	45	0.11875	5.34	0.263	2.42×10^6	1.089×10^8	2.038×10^7	1.92

La purificación de la toxina intracelular por método bioquímico, demuestra que el rendimiento del producto final constituye solamente el 0.26% de la proteína inicial, aunque por el método biológico se detecta el 1.92%

Conc. Prot. = Concentración de proteína
 Prot. Tot. = Proteína total
 D.M.M. = Dosis mínima mortal
 Ac. Esp. = Actividad específica
 N.D. = No determinado

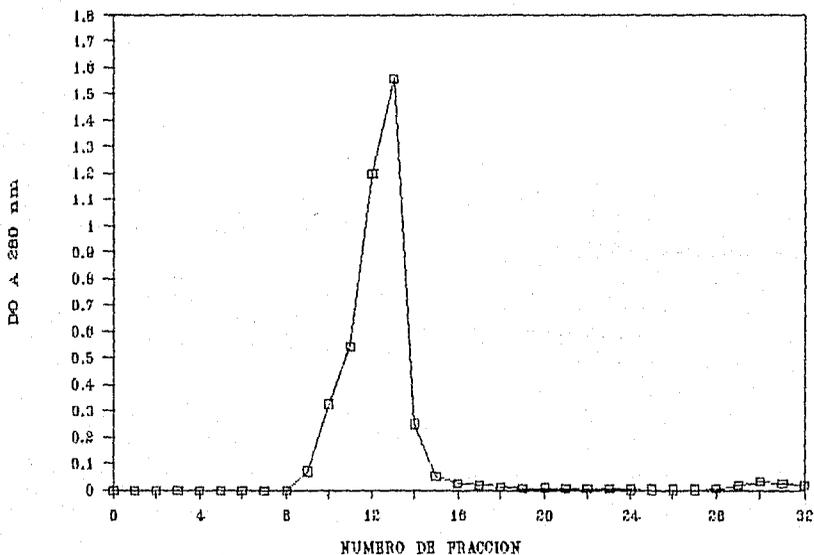


Figura No. 4.-Cromatografía en DEAE-Celulosa de la toxina intracelular donde se registra una sola fracción formada por las fracciones 10 al 14. La columna fué de 0.9 x 45 cm en solución de EDTA disódico 0.01 M pH 7.6 con una velocidad de flujo de 12.6 ml/h. Las fracciones colectadas fueron de 2.1 ml. La cantidad de muestra fué de 27 mg en un volúmen de 2 ml. El gradiente discontinuo de NaCl logró extraer pequeños contaminantes de la toxina, que no se muestran en la gráfica por estar en los tubos del 30 al 100.

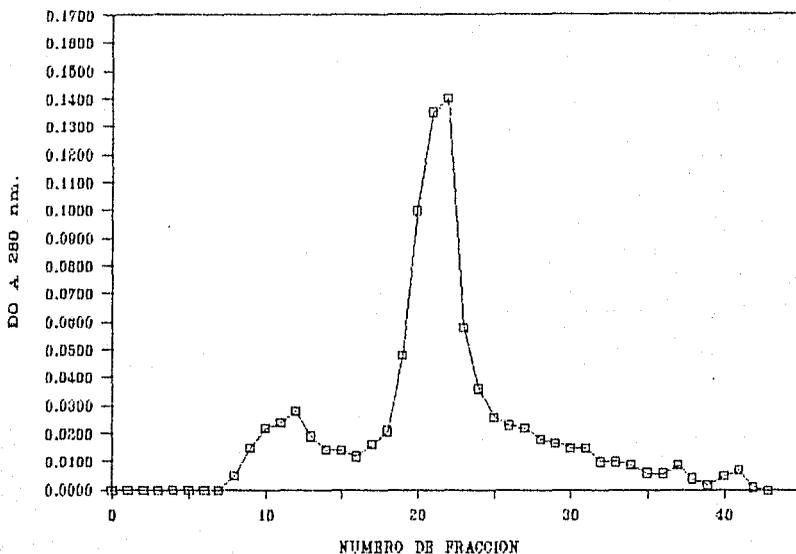


Figura No. 5.-Cromatografía en DEAE-Sephadex A-50 de la fracción 1 resultante de la cromatografía de intercambio iónico de la toxina intracelular. La columna fué de 0.9 x 60 cm en solución de Tris Base 0.05 M EDTA disódico 0.01 M pH 8.0 con una velocidad de flujo de 8 ml/h. Las fracciones colectadas fueron de 4 ml. La muestra fué de 8.66 mg en 4.5 ml. Se encuentran dos fracciones distintas, la Fracción I formada del tubo 9 al 13 y la fracción II del tubo 17 al 27. La fracción II fué identificada como toxina tetánica con un mayor grado de pureza que la encontrada en la fracción I de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de pureza realizado en electroforesis en gel de acrilamida.

Cuadro 4
PURIFICACION DE TOXINA EXTRACELULAR

	Volumen ml.	Conc.Prot. mg/ml	Prot.Total. mg	Proteína %	D.M.M. /ml.	D.M.M. Total.	Ac. Esp. mg/Prot.	D.M.M. %
Toxina cruda extracelular	935	10.1	9443	100	7.2×10^7	6.73×10^9	7.62×10^3	100
Sobrenadante sulfato de amonio.	2125	5.6	89	94.51	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Precipitado sulfato de amonio 54%.	200	2.48	496	5.25	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Sobrenadante fosfatos 1.26 M.	106	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Precipitado fosfatos 1.26 M.	30	0.083	2.5	0.026	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Sobrenadante fosfatos 1.75 M.	9	21.6	194.21	2.05	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Precipitado fosfatos 1.75 M.	30	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Sobrenadante con mentanol y acetatos.	10	5	50	0.529	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Precipitado con mentanol y acetatos.	30	0.78	23.4	0.247	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Elución columna DEAE-celulosa.IV-V.	10	0.87	8.7	0.092	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Elución columna Sephadex G100 I.	13	0.0973	1.2166	0.0128	5.62×10^4	7.3×10^5	5.77×10^5	0.0108

La purificación de la toxina extracelular por el método bioquímico demuestra que el rendimiento del producto final constituye solamente 0.0128% de la proteína inicial y por el método biológico se detecta 0.0108%

Conc. Prot. = Concentración de proteína Prot. Total = Proteína total D.M.M. = Dosis mínima mortal
Ac. Esp. = Actividad Específica N.D. = No determinado.

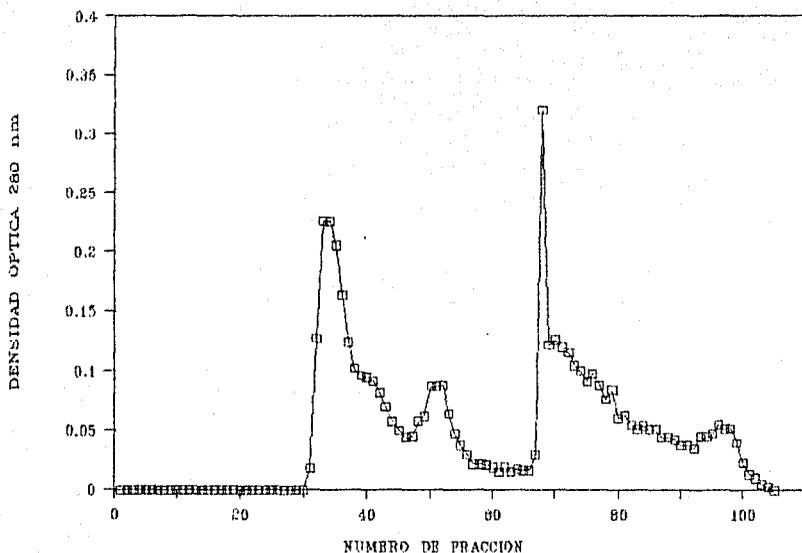


Figura No. 1.-Cromatografía en DEAE Celulosa. Columna de 2.6 x 68 cm, amortiguador de elución EDTA disódico 0.01 M pH 7.6, velocidad: 48 ml/h. muestra: 50 mg en 10 ml, se colectaron volúmenes de 6 ml. Las fracciones colectadas se reunieron de la siguiente manera: Fracción I del tubo 31 al 35, Fracción II del tubo 36 al 38, Fracción III del tubo 39 al 46, Fracción IV del tubo 47 al 56, y la Fracción V del tubo 57 al 66. Posteriormente se lavó la columna con un gradiente discontinuo 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, y 1.0 M de NaCl. Las fracciones IV y V se reunieron posteriormente al análisis de pureza con la técnica de electroforesis en acrilamida, para continuar con la purificación. La cantidad de proteína en estas dos fracciones fué de 8.7 mg.

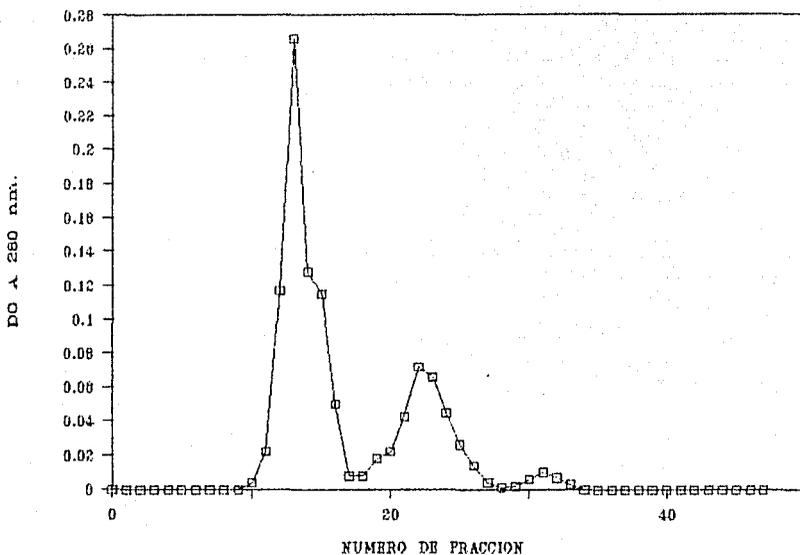


Figura No.2.-Cromatografía en Sephadex G-100 grueso. Columna de 1.6 x 60 cm; amortiguador de elución fosfatos 0.01 M pH 7.6, velocidad 5 ml/h. Muestra 8.7 mg en 10 ml, se colectaron volúmenes de 2.5 ml y se formaron 4 fracciones, de la siguiente manera: Fracción I del tubo 10 al 13, Fracción II del tubo 14 al 16, Fracción III del tubo 20 al 26 y la Fracción IV del tubo 30 al 33. En la fracción I se encontró la actividad de la toxina tetánica en un volumen de 13 ml conteniendo 1.26 mg de proteína total.

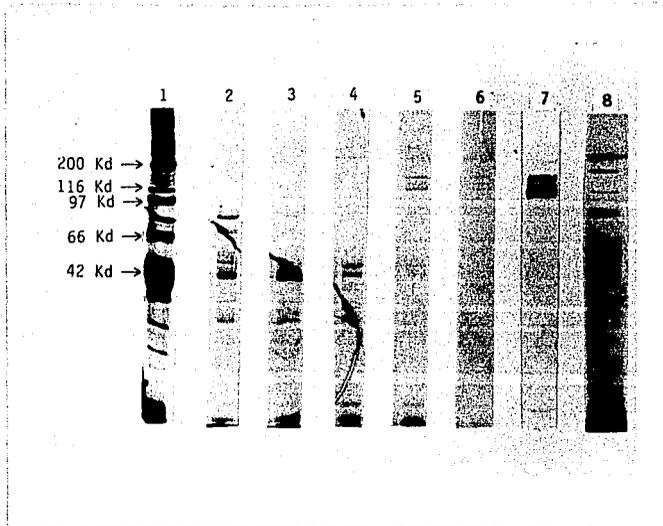


Figura No.3.-Electroforesis en geles de acrilamida al 10 % con 1% de SDS, teñidos con nitrato de plata la cantidad de proteína por carril es de 10 ug. En el carril 1 se encuentran los estándares de pesos moleculares, en los carriles 2, 3, 4 , 5, 6, se encuentran: la fracción 1; la fracción 2; la fracción 3; la fracción 4; y la fracción 5 sde la cromatografía en DEAE Celulosa de la toxina extracelular; en el carril 7 se encuentra la fracción 1 de la cromatografía en Sephadex G-100; en el carril 8 una muestra de la toxina cruda extracelular.

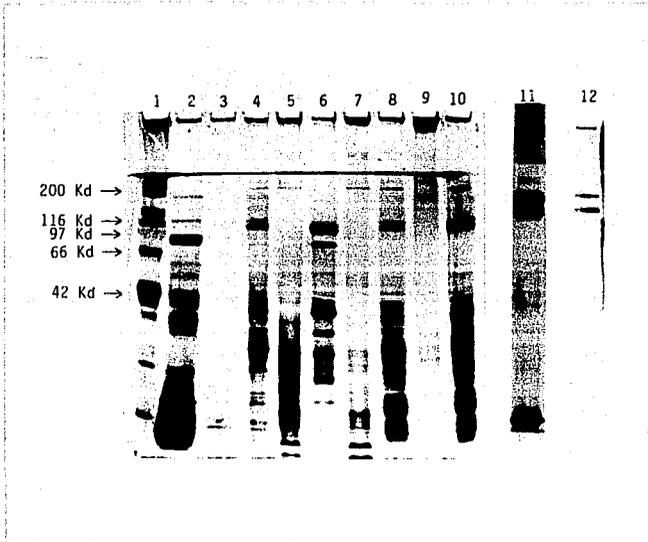


Figura No.6.-Electroforesis en gel de acrilamida al 10% teñido con nitrato de plata en cada carril se encuentran 30 ug excepto del carril 12 donde solamente se colocaron 10 ug de muestra. En el carril 1 estandares de pesos moleculares, carril 2 toxina cruda extracelular, carril 3 medio de cultivo donde creció la bacteria durante 84 h, carril 4 sobrenadante de la lisis bacteriana, carril 5 producto de la lisis bacteriana concentrado con sulfato de amonio, carril 6 sobrenadante de la precipitación con sulfato de amonio, carriles 7 y 8 precipitado y sobrenadante con fosfatos 1.15 M, carriles 9 y 10 precipitado y sobrenadante con fosfatos 1.75 M, carril 11 fracción I de la cromatografía en DEAE-Celulosa, carril 12 fracción II de la cromatografía en DEAE-Sephadex A-50. Claramente se observan dos bandas como resultado final de la purificación de la toxina intracelular.

Cuadro 1
ESQUEMA DE INMUNIZACION TOXINA INTRACELULAR

Día	Dosis ug/conejo	V í a	<u>RESPUESTA HUMORAL/DID</u>	
			Conejo 1 (2 Kg) Inicial	Conejo 2 (1.5 Kg) Inicial
1	200 + A.C.F.	S.C. y (C.P.)	N.D.	N.D.
20	200 + A.C.F.	S.C.	N.D.	N.D.
35	200	I.M.	1:32	1:32
50	200	I.M.	1:32	1:64

La toxina intracelular putificada por métodos bioquímicos; la dosificación está en relación a la cantidad de proteína en el musculo. La respuesta humoral medida por DID expresa la dilución máxima a la que se observa precipitación.-
Las diluciones del suero son seriadas

A.C.F. = Adyuvante completo de Freund
S.C. = Subcutánea
C.P. = Cojinete Plantar
I.M. = Intramuscular
N.D. = No determinado
D.I.D. = Doble Inmunodifusión

Cuadro 2
ESQUEMA DE INMUNIZACION TOXINA DEL MEDIO DE
CULTIVO

Día	Dosis ug/conejo	V í a	<u>RESPUESTA HUMORAL/DID</u>	
			Conejo 1 (2 Kg) Inicial	Conejo 2 (1.5 Kg) Inicial
1	121.6 + A.C.F.	S.C.	N.D.	N.D.
15	121.5 + A.C.F.	S.C. y (C.P.)	N.D.	N.D.
30	121.6	I.M.	N.D.	N.D.
50	121.6	I.M.	1:128	1:512

La toxina extracelular purificada por métodos bioquímicos la dosificación se realizó en relación al contenido de proteínas. La respuesta humoral fué medida en DID y se expresa como la dilución última que precipita el antígeno crudo. Las diluciones son seriadas.

A.C.F. = Adyuvante completo de Freund
 S.C. = Subcutánea
 C.P. = Cojinete Plantar
 I.M. = Intramuscular
 N.D. = No determinado
 D.I.D. = Doble inmunodifusión

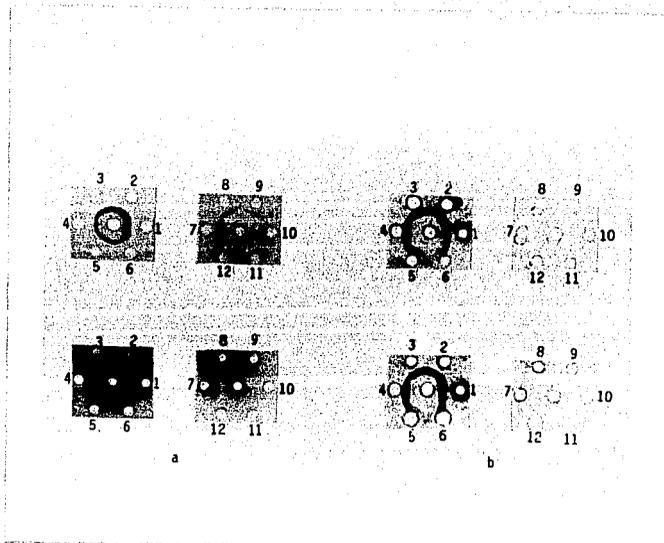


Figura No.7.-DID en agar al 1 % en PBS pH 7.2. En el orificio central se colocó toxina cruda a una concentración de 27.1 mg/ml, en los orificios laterales se colocaron diluciones seriadas con PBS de los sueros de los conejos inmunizados con toxoide purificado de la toxina extracelular en la figura a) y de los sueros de los conejos inmunizados con el toxoide purificado a partir de la toxina intracelular en la figura b). Después de secados los geles se tiñieron con negro de amido al 1% en ácido acético al 10 %. En la figura a) se observan dos bandas mientras que en la figura b) se observa una sola banda, indicando que los conejos inmunizados reconocen dos y una molécula entre los componentes de la toxina cruda.

Cuadro 5
PURIFICACION DE LA TOXINA EXTRACELULAR

	Volumen ml.	Conc. Prot. mg/ml.	Prot. Total mg.	Proteína %	D.M.M. ml.	D.M.M. Total	Ac. Esp. mg/Prot.	D.M.M. %
Toxina extracelular cruda	25	4.6	115	100	3.1×10^5	3.56×10^7	6.7×10^4	100
Primer eluido	25	1.66	41.5	36.08	0.0	0.0	0.0	0.0
Proteína lavada	N.D.	N.D.	73.1	63.56	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Proteína purificada en Tris 0.05 M EDTA disó- dico 0.01 M pH 7.6.	2	0.2	0.4	0.34	2.42×10^5	4.84×10^5	1.21×10^6	1.35

La purificación de la toxina extracelular por cromatografía de afinidad, demuestra que el rendimiento del producto final constituye el 0.34% de la proteína inicial, aunque el método biológico detecta 1.35%

Conc. Prot. = Concentración de proteína
 Prot. Total = Proteína Total
 D.M.M. = Dosis Mínima Mortal
 Ac. Esp. = Actividad Específica
 N.D. = No determinado

Cuadro 6
PURIFICACION DE LA TOXINA INTRACELULAR

	Vólumen ml.	Conc. Prot. mg/ml	Prot.Total mg	Proteína %	D.M.M. /ml	D.M.M. Total	Ac. Esp. mg/Prot.	D.M.M. %
Toxina intracelular cruda	10	0.55	5.5	100	2.1×10^5	2.1×10^6	3.8×10^5	100
Primer eluido	10	0.116	1.16	21.09	0.0	0.0	0.0	0.0
Proteína lavada	N.D.	N.D.	4.13	75.09	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Proteína purificada en Tris 0.05 M EDTA disód- ico 0.01 M pH 7.6.	1.8	0.117	0.21	3.8	3.48×10^2	6.26×10^6	2.97×10^3	0.0298

La purificación de la toxina intracelular por cromatografía de afinidad, demuestra que el rendimiento del producto final constituye el 3.8% de la proteína inicial, aunque el método biológico detecta 0.0298%.

Conc. Prot. = Concentración de proteína
 Prot. Total = Proteína Total
 D.M.M. = Dosis Mínima mortal
 Ac. Esp. = Actividad Específica
 N.D. = No determinado

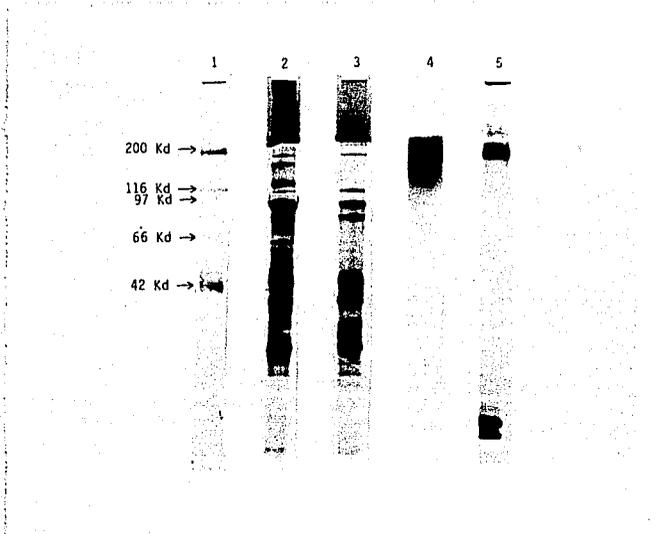


Figura No. 8.-Electroforesis en gel de acrilamida al 10% teñido con nitrato de plata, se colocaron 20 ug en cada carril. En el carril 1 se encuentran los estándares de pesos moleculares, en el 2 la toxina cruda intracelular, en el carril 3 se encuentra el eluido de la columna Sefarosa 6B, en el carril 4 la toxina purificada en el sistema de afinidad a partir de la toxina intracelular, en el carril 5 se encuentra la toxina purificada en el sistema de afinidad a partir de la toxina extracelular. Se observa de manera definitiva y clara la extracción de dos bandas del extracto crudo de toxina intracelular (carril 2), los cuales se encuentran ausentes en el eluido (carril 3) para aparecer como únicos productos de la cromatografía (carril 4). Curiosamente la toxina purificada con la misma columna a partir de la toxina extracelular muestra 7 bandas (carril 5).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los procesos de obtención y purificación de toxina tetánica y su detoxificación para convertirla en toxoide para uso en humanos, están bien estandarizados en los laboratorios de producción. En el Instituto Nacional de Higiene el método de purificación como se mencionó anteriormente, consiste solo en la precipitación con sulfato de amonio para alcanzar los requisitos mínimos exigidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (20). Como se mencionó éste producto adolece de tener efectos secundarios cuya intensidad puede variar de un individuo a otro, aunque debe reconocerse que la generalidad de la población vacunada acepta bien el producto y la respuesta inmune obtenida es adecuada.

Estudios previos han demostrado que resulta imposible purificar el toxoide tetánico, dado que los puentes metilénicos que se forman entre las diferentes moléculas por la actividad del formaldehído resultan al azar (21). Por tal motivo este trabajo se dirigió a la purificación de toxina tetánica para su detoxificación posterior. El método bioquímico ensayado permitió la obtención de productos semipuros, ya que cuando se trabajó con toxina extracelular se obtuvo un producto con 4 bandas demostradas en electroforesis en geles de acrilamida-SDS, mientras que se logra tener un producto de solo dos bandas cuando se trabaja con toxina intracelular. Sin embargo este sistema por su complejidad resulta

inadecuado para implementarlo a nivel industrial.

La purificación empleando la cromatografía de afinidad permitió en un solo paso lograr la purificación de toxina tetánica a un nivel comparativo al alcanzado con el método bioquímico. Se comprobó la purificación con el mismo sistema de electroforesis en geles de acrilamida con SDS y la actividad de la toxina fué analizada observando el efecto tóxico en ratones. Muy interesante resulta el hecho de que la purificación de la toxina ya sea por métodos bioquímicos o por cromatografía de afinidad, se facilita cuando se inicia con toxina intracelular, encontrando una pureza de sólo dos bandas en la electroforesis, mientras que cuando se inicia con toxina extracelular, el producto final muestra 4 bandas cuando se purifica por métodos bioquímicos y 7 bandas cuando se purifica por cromatografía de afinidad, a pesar de que la columna que se utiliza para este proceso, tiene unidos los anticuerpos contra la toxina intracelular purificada por métodos bioquímicos y que permite tener un producto de solo dos bandas cuando se utiliza toxina intracelular. El porqué se obtienen productos con mayor número de contaminantes cuando se inicia la purificación a partir de la toxina

extracelular resulta de difícil explicación, aunque se puede pensar que el medio de cultivo y el tiempo requerido para la lisis celular, permite a la vez el rompimiento de la molécula de toxina en fragmentos pequeños que pueden ser reconocidos por los anticuerpos; la misma explicación puede ser válida para la molécula copurificada con la toxina intracelular, ya que teóricamente la molécula pura, debería mostrar una sola banda en los geles de acrilamida-SDS sin agentes reductores.

Otro evento que resulta importante de discutir, es la pérdida de actividad específica de la toxina intracelular purificada por cromatografía de afinidad, la cual resulta claramente menor (2.97×10^3) que la lograda en el caso de la toxina extracelular, (1.21×10^6) que muestra mayor número de contaminantes, y aún menor que el producto inicial antes de la cromatografía; en este sentido se podría pensar que los contaminantes (6 bandas mas) de la toxina extracelular, ayudan a estabilizar las propiedades biológicas de la molécula, pues es reconocido que las proteínas a mayor pureza son habitualmente mas inestables (25). Cuando hablamos de la actividad tóxica de la toxina intracelular, se puede pensar que el exceso de glicina usado para cambiar el pH y desprender la toxina de los anticuerpos lesionó su actividad tóxica, ó bien que la actividad se perdió durante su almacenamiento. En este sentido aunque se

pueden aducir estos factores como los importantes en la pérdida de la toxicidad de la molécula, en otro renglón no tenemos ningún indicio de que tal fenómeno lesione la actividad inmunogénica para lo cual tendrían que hacerse las pruebas pertinentes.

Finalmente se puede decir que se logró implementar una metodología que permite la purificación de la toxina tetánica en un solo paso, a partir de un extracto crudo que contiene mas de 30 contaminantes, dicho sistema por su sencillez es factible de escalar a nivel industrial. El éxito del método se comprueba por el análisis de pureza realizado por electroforesis en geles de acrilamida-SDS, donde cabe resaltar la capacidad de la sefarosa-IgG que logra retener la molécula de toxina como se demuestra por la desaparición de las bandas específicas en los eluidos de la cromatografía de afinidad (Figura 8, carril 4); y la desaparición al mismo tiempo de la toxicidad del mismo eluido, demostrado en el sistema biológico ratón.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Germanier, R.:1984. en *Bacterial Vaccines* 1a. Edición. Academic Press, Inc. London. 38-64.
- 2.- Carrada Bravo, T.:1977. Epidemiología del tétanos en la República Mexicana. *Salud Pública de México*. 19 (3); 335-353.
- 3.- Van Heyningen, W.E., Bellanby, J.: 1971. Tetanus toxin in: S. Kadis et al (editors) *Microbial Toxin vol II A Bacterial proteins toxins*, 69-108, New York, London, Academic Press.
- 4.- Curtis, R. and De Groat, W.C.: Tetanus toxin and spinal inhibition. 1968. *Exptl. Brain Res.* 10, 208-212.
- 5.- Bizzini, B., Turpin, A., and Raynaud, M.: 1973. On the structure of tetanus toxin. *Naunyn Schimmlerberg's Arch. Pharmacol.* 227, 271-288.
- 6.- Matsuda, M. and Yoneda, M.: 1975. Isolation and purification of two antigenically active, "complementary" polipeptide fragments of tetanus neurotoxin, *Infect and Immun.* 12, 1147-1153.
- 7.- Torsten, B., Parchat, S.H., and Engelhardt, H.: 1979. Structure of tetanus toxin. Demonstration and separation of specific enzyme converting intracellular tetanus toxin to the extracellular form. *J. of Biol. Chem.* 254, 10728-10733.
- 8.- Boroff, D.A., and DasGupta, B.R.: 1971. Cap 1 Botulinum toxin en *Microbial toxins vol II A. Bacterial Protein Toxins*. Academic Press. New York and London. 1-62.
- 9.- Blass, J., Bizzini, B., et Raynaud, M.: 1969. Etude sur le mecanisme de la detoxification des toxines proteiques par le formol. *Ann. Inst. Pasteur, Paris.* 116, 501-521.
- 10.- Carrada Bravo, T.: 1977. La vacunación antitetánica en la República Mexicana. *Investigación preliminar. Salud Púb. de México.* 19 (4); 579-596.
- 11.- Bizzini, B., Turpin. A., et Raynaud, M.: 1969.

Production et purification de la toxine tetanique. Ann Inst. Pasteur. 116, 686-712.

12.-Barbosa, H.: 1979. Toxina y antitoxinas tetánicas: Procesos de Purificación y producción a nivel industrial. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Medicina, UNAM.

13.-Lowry, H., Rosebrough, J., Farr, L., and Randall, J.: 1952. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

14.-Ouchterlony, O.: 1968. Handbook of immunodiffusion and Immunoelectrophoresis. Ann Harbor Science Publishers Mich.

15.-March, S.C., Parikh, I., and Cuatrecasas, P.:1971 A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. Analytical Biochem. 60; 149-152.

16.-Laemmli, U, K.: 1970. Clavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature.227;680-683.

17.-Hueckeshoven, J., and Darnick, R.:1985 Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. Electrophoresis.6;103-112.

18.-Katzin, M.A., Zingales, B., and Colli, W.:1984. Identification of trypanosomatid surface glycoproteins by affinity chromatography. In Genes and antigens of parasites. A laboratory manual. C. M. Morel ed.339-346.

19.-Nájera, A.N., González, M., García, S., Gómez, J., Sanchez, V., Pérez de la Mora C., Villalba H., y Domínguez, H.: 1984. Producción y control de toxoide tetánico. en Manual de Laboratorio de Producción y control de Biológicos. IPN.

20.-World Health Organization. Experts committee.: 1979. "Manual for the production and control for vaccines". Blg/UNDP/77.2 Rev.I Geneve.

21.-Flores, I.: 1987. Importancia de la putificación del toxoide tetánico en la respuesta inmune. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.

22.- Kumate, J., Gutiérrez, G. 1978. Manual de Infectología. 6a edición. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. México, pag 208-220.

23.- Cristensen, P:E.1974. Reacciones secundarias al toxoide tetánico en Bol. Of. San. Panam. 76: 420.

24.- Rubbo, S.D.1966. New approaches to tetanus prophylaxis. The Lancet 27: 449-453.

25.- Klotz, I.M. 1953.in The Proteins vol,I cap 8 Protein interactions. Academic. Press.pag 727-807.