

**Universidad ORT Uruguay  
Facultad de Ingeniería**

**Soportes de afinidad para la purificación de anticuerpos  
anti toxina épsilon de *Clostridium perfringens***

Entregado como requisito para la obtención del título de Licenciado en Biotecnología

**Rodrigo Barreto – 161352**

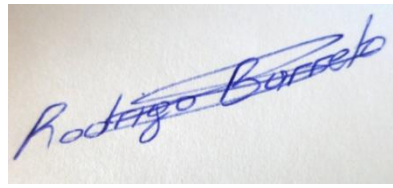
**Tutor: Lorena Betancor**

**2014**

## Declaración de autoría

Yo, Rodrigo Andrés Barreto González, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba mi proyecto final de carrera para la obtención del título de grado de Licenciado en Biotecnología;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibida;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mi persona;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se ha realizado las aclaraciones correspondientes.

A photograph of a handwritten signature in blue ink on a light-colored surface. The signature reads "Rodrigo Barreto" in a cursive script.

Rodrigo Barreto 29/02/2014

## Agradecimientos

En primer lugar, quisiera dar las gracias a mi tutora, la PhD. Lorena Betancor, por su apoyo constante y motivación impartida, sin los cuales el recorrido de este camino no hubiese resultado tan fructífero y gratificante. Su generosidad al momento de compartir su vasta experiencia, y su interés por el crecimiento intelectual y personal de sus alumnos, han sido determinantes en la realización exitosa de este ambicioso proyecto; y han influido valiosamente en el desarrollo humano y profesional del autor de esta obra.

En segundo lugar, quiero agradecer al MSc. Eduardo Reolón, Coordinador de Investigación y Desarrollo de Laboratorios Santa Elena, por su asesoría y colaboración en la realización de este trabajo.

Luego, quisiera agradecer a la MSc. Mariana Ferrari, por su cooperación en la realización de este proyecto, y sus consejos prácticos para hacer frente a problemas que fueron surgiendo durante el desarrollo del mismo.

Quisiera agradecer también a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por el financiamiento de mi Beca de Iniciación a la Investigación y el proyecto Alianzas para la Innovación entre Laboratorios Santa Elena y Universidad ORT Uruguay.

Finalmente quiero extender un agradecimiento general y sincero a todos los integrantes del grupo de investigación del Laboratorio de Biotecnología de Universidad ORT Uruguay: Lorena Betancor, Angela Cabezas, Mariana Ferrari, Carlos Sanguinetti, Mariana Umpiérrez, Erienne Jackson, Natalia Scioscia y Diego Cazaban; por su buena disposición al momento de responder dudas o ayudar en la solución de problemas relacionados a este proyecto; por haber aprendido algo de cada uno de ellos, y por su calidez humana, que han hecho de cada día de trabajo un día ameno, disfrutable y memorable.

¡Muchas gracias!

## Resumen

La toxina épsilon de *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), es uno de los principales agentes causantes de la enterotoxemia hemorrágica del ganado, una infección muy potente y con alta tasa de mortalidad, que afecta gravemente a las economías que obtienen gran parte de sus ingresos en base a la producción ganadera.

Actualmente, la producción de esta toxina, para la formulación de vacunas, se lleva a cabo mediante un proceso de fermentación, y sucesivos pasos posteriores de purificación, entre los que se cuentan un paso inicial de centrifugación, y un segundo paso de filtración, para aislar la toxina épsilon del resto de los componentes del caldo de cultivo; y un paso final de inactivación de la toxina con formaldehído.

El procedimiento mencionado permite obtener rendimientos de purificación moderados, lo cual implica que parte de la toxina producida por el proceso de fermentación se pierda durante los pasos downstream de purificación; lo cual se traduce en pérdidas económicas para la empresa.

Por lo tanto, este proceso puede ser mejorado, y por esta razón, se ha planteado el desarrollo de tecnologías de purificación de proteínas de última generación, basadas en métodos cromatográficos.

Por otra parte, Laboratorios Santa Elena monitorea la producción de toxina en sus cultivos por medio de ensayos in vivo, que presentan muchas desventajas con respecto a los métodos de diagnóstico actuales. Por esto, se ha propuesto también encarar la purificación de anticuerpos específicos contra toxina épsilon, de cara al desarrollo de un procedimiento cualitativo y cuantitativo alternativo, en formato de kit de ELISA o de un sistema moderno basado en el uso de nanopartículas de oro funcionalizadas con estos anticuerpos, que sustituya el uso de animales y facilite y disminuya los costos de la producción de esta toxina.

En este trabajo, se reporta la obtención de dos soportes cromatográficos funcionales, para ser utilizados en la purificación de toxina épsilon. Uno de ellos que permitió lograr un grado de pureza de esta proteína mayor al 90%. Además, se describe el camino seguido para lograr la purificación exitosa de anticuerpos anti toxina épsilon a partir de una muestra comercial y un suero hiperinmune, mediante la elaboración de un tercer soporte cromatográfico, diseñado específicamente para este fin.

## Palabras clave

*Clostridium perfringens*, toxina épsilon, cromatografía, inmovilización, anticuerpos, inmunoensayo, nanotecnología, purificación, MANAE, Glioxil, heterofuncional, vacunas, ganado, síntesis.

## Índice

1. Introducción .....	8
1.1. <i>Clostridium perfringens</i> .....	9
1.2. Toxina épsilon.....	9
1.3. Infecciones causadas por la toxina épsilon .....	11
1.4. Lesiones post mortem .....	12
1.5. Producción de vacunas para prevención de la infección causada por la toxina épsilon .....	12
1.6. Producción de vacunas clostridiales por Laboratorios Santa Elena .....	13
1.7. Purificación de proteínas.....	14
1.7.1. Metodologías cromatográficas de última generación .....	14
1.7.2. Soportes cromatográficos utilizados en este trabajo.....	15
1.8. Purificación de anticuerpos anti toxina épsilon .....	16
2. Objetivos.....	19
2.1. Objetivo general .....	19
2.2. Objetivos específicos .....	19
3. Materiales.....	20
3.1. Cuantificación de proteínas por método BCA: .....	20
3.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):.....	20
3.3. Síntesis de Glioxil:.....	20
3.4. Síntesis de MANAE: .....	20
3.5. Purificación de toxina épsilon e Inmovilización de toxina épsilon a Glioxil: .....	20
3.6. Síntesis de Glioxil/IDA – Ac:.....	20
3.7. Purificación de anticuerpos anti toxina épsilon de <i>C.perfringens</i> : .....	21
4. Metodología .....	22
4.1. Análisis bioinformático de la toxina épsilon de <i>C. perfringens</i> .....	22
4.2. Síntesis de soporte cromatográfico de intercambio iónico para la purificación de toxina épsilon .....	22
4.2.1. Síntesis de MANAE .....	22
4.3. Purificación de toxina épsilon por cromatografía de intercambio iónico .....	24
4.3.1. Evaluación de la unión de la toxina épsilon de <i>C. perfringens</i> a MANAE.....	24
4.4. Síntesis de soporte cromatográfico de afinidad para la purificación de toxina épsilon .....	25
4.4.1. Síntesis de soporte Glioxil IDA-Ac .....	25
4.5 Purificación de toxina épsilon por cromatografía afinidad .....	26

4.5.1. Unión de la toxina .....	26
4.5.2. Elución de la toxina .....	26
4.6. Síntesis de soporte cromatográfico de afinidad para la purificación de anticuerpos anti toxina épsilon de <i>C.perfringens</i> .....	26
4.6.1. Inmovilización de toxina épsilon a Glioxil agarosa .....	26
4.7. Purificación de anticuerpos anti toxina épsilon de <i>C. perfringens</i> .....	27
5. Resultados y Discusión .....	28
5.1 Análisis bioinformático de la toxina épsilon de <i>C.perfringens</i> .....	28
5.2. Síntesis de soportes cromatográficos para la purificación de toxina épsilon .....	29
5.2.1. Síntesis de MANAE .....	29
5.3. Purificación de toxina épsilon por cromatografía de intercambio iónico .....	29
5.3.1. Evaluación de la unión de la toxina épsilon al MANAE Lote I .....	29
5.3.2. Evaluación de la unión de la toxina épsilon al MANAE Lote II .....	30
5.3.3. Evaluación de la unión de la toxina épsilon al MANAE Lote III .....	30
5.3.4. Evaluación de la unión de la toxina épsilon al MANAE Lote IV .....	31
5.3.5. Evaluación de la purificación de toxina épsilon en condiciones controladas de pH .....	31
5.3.6. Evaluación de la unión de la toxina épsilon en buffer fosfato, en condiciones controladas de pH .....	32
5.3.7. Optimización de la relación MANAE-toxina a utilizar .....	33
5.3.8. Evaluación de interferencia en la unión de la toxina épsilon por presencia de antiespumante .....	34
5.4. Purificación de toxina épsilon por cromatografía afinidad .....	35
5.4.1. Inmovilización de anticuerpos a soporte heterofuncional .....	35
5.4.2. Evaluación de la unión de toxina épsilon a soporte Glioxil/IDA - Ac .....	36
5.4.3. Elución de la toxina épsilon .....	37
5.5. Purificación de anticuerpos anti toxina épsilon .....	39
5.5.1. Inmovilización de toxina épsilon a Glioxil .....	39
5.5.2. Purificación de anticuerpos anti toxina épsilon de <i>C.perfringens</i> .....	39
6. Análisis Económico .....	41
7. Conclusión .....	42
8. Referencias bibliográficas .....	43

## 1. Introducción

El presente trabajo se encuentra enmarcado dentro de un proyecto de mayor escala, comprendido en un programa Alianzas para la Innovación, entre Laboratorios Santa Elena y Universidad ORT Uruguay, financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

En éste, se abordó el desarrollo de un proceso altamente eficiente para la purificación de toxinas épsilon de *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), para ser utilizadas en la fabricación de vacunas veterinarias clostridiales.

El trabajo incluyó el diseño de soportes a medida para la adsorción específica y reversible de la molécula diana en un único paso cromatográfico.

La purificación de moléculas de aplicación biotecnológica es muchas veces un proceso complejo que consta de muchos pasos. A nivel industrial cada paso de purificación aplicado representa un elevado aumento de los costos de producción para las empresas, debido a la compra de insumos y al tiempo invertido (1). Por estas razones es de interés para la industria, encontrar alternativas tecnológicas para la purificación de estas moléculas, que impliquen una mínima cantidad de pasos, y que no comprometan el alto grado de pureza ni la calidad del producto. Esto es especialmente importante en el caso de la preparación de vacunas, sean de uso médico o veterinario, dadas las posibles complicaciones de toxicidad, inmunogenicidades variables, respuestas inflamatorias, entre otras.

En base a la premisa anterior, se propuso en paralelo, el diseño de un protocolo de inmovilización de la toxina purificada a una matriz de agarosa, con el fin de utilizar el derivado sintetizado como soporte cromatográfico para la purificación de anticuerpos específicos contra la toxina épsilon a partir de un suero hiperinmune.

El motivo de la purificación de estos anticuerpos, recae en la necesidad de desarrollar una metodología de alta sensibilidad que permita controlar la pureza de la toxina producida y poder evaluar el proceso productivo a lo largo del tiempo, para determinar el punto de máxima producción y detener el cultivo, con el fin de ahorrar recursos.

La estrategia consistió en crear una tecnología sencilla, eficaz y económicamente ventajosa que permitiera la sostenibilidad del proceso y fuera fácil de implementar; puesto que de encontrarse, se generarían beneficios para Laboratorios Santa Elena y resultados protegibles, así como la posibilidad de conseguir un método de detección, y posiblemente cuantificación de la toxina factible de ser comercializado.

De esta manera, se estaría satisfaciendo la necesidad de optimizar procesos habituales para generar ahorros a la empresa y potenciar los ingresos generados, cumpliendo además con las continuamente desafiantes exigencias del mercado de la salud animal; logrando con ello colaborar con el posicionamiento de Laboratorios Santa Elena como una empresa emprendedora, comprometida con el desarrollo y la innovación.

### 1.1. *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* es una bacteria Gram positiva, formadora de esporas, anaerobia estricta (2). Está ampliamente distribuida en la naturaleza; puede ser encontrada comúnmente en el sistema gastrointestinal de animales y humanos, y en algunos casos, puede ser patogénica para su hospedador (3).

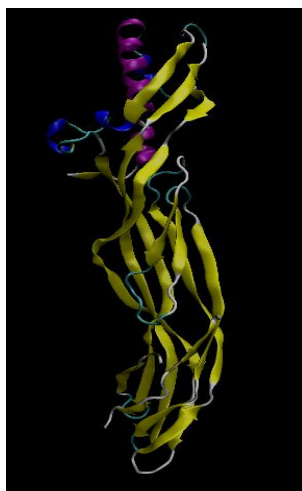
Existen cinco cepas de *C. perfringens*, designadas desde la A hasta E. Cada cepa produce un espectro de toxinas único. La toxina épsilon es producida por los tipos B y D. Esta toxina es una proteína que forma poros; provoca que las células derramen potasio y fluido. Además de la toxina épsilon, las cepas tipo D de *C. perfringens* producen toxina alfa, y las cepas de tipo B producen toxinas alfa y beta. El tipo B de *C. perfringens* provoca enteritis severa en los terneros, potrillos, corderos y los lechones jóvenes. El tipo D provoca enterotoxemia en ovejas y cabras y, en raras ocasiones, en ganado bovino. Además, la cepa tipo E produce la toxina iota (ver tabla 1). Las cinco cepas pueden infectar las heridas de cualquiera de las especies mencionadas (3-4).

Cepa de <i>Clostridium perfringens</i>	Toxinas
Tipo A	Alfa
Tipo B	Alfa, Beta, Épsilon
Tipo C	Alfa, Beta
Tipo D	Alfa, Épsilon
Tipo E	Alfa, Iota

**Tabla 1.** Clasificación de cepas de *C. perfringens*, según el espectro de toxinas que producen (4).

### 1.2. Toxina épsilon

Más del 25% de las toxinas proteicas bacterianas pertenecen al grupo de toxinas formadoras de poro, la mayor categoría de factores virulentos bacterianos. La toxina épsilon de *C. perfringens* es una toxina estructuralmente similar a otras toxinas formadoras de poro (ver figura 1). Se sabe que es la toxina más potente producida por esta bacteria, y la tercer toxina clostridial más potente, luego de las toxinas tetánica y botulínica (5); además es considerada como una toxina de categoría B por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC, por sus siglas en inglés), por su rol potencial como arma de terrorismo biológico (6).



**Figura 1. Representación tridimensional de la toxina épsilon.** Las coordenadas de la toxina se encuentran depositadas en el Protein Data Bank, con código de acceso 1UYJ.

Esta toxina es producida como una pro-toxina inactiva, con un peso molecular aproximado de 33 kDa, y luego es activada por clivaje proteolítico del precursor inactivo por alguna de las siguientes enzimas: tripsina, quimotripsina y  $\lambda$ -proteasa producidas por *C.perfringens*. La activación se da por la escisión de los residuos 13 y 29 por sus N y C terminal, respectivamente. En su condición de toxina activa posee un peso molecular aproximado de 32 kDa (5, 7).

Se ha clasificado a esta toxina dentro de la familia de las toxinas  $\beta$  formadoras de poro, en base a las siguientes observaciones: (i) la toxina épsilon puede formar un gran complejo en la membrana de células de riñón canino Madin-Darby (MDCK), y permeabilizarlas; (ii) el gran complejo formado por la toxina épsilon no puede ser disociado por tratamiento con SDS, lo cual es una característica común de las toxinas formadoras de poro; y (iii) el espectro de dicroísmo circular de la toxina épsilon muestra que esta consiste principalmente en hojas  $\beta$ , tal como se puede observar en las toxinas formadoras de poro con disposición de barriles  $\beta$  (5).

La toxina actúa aumentando la permeabilidad intestinal para facilitar la entrada del patógeno (*C.perfringens*) al torrente sanguíneo. La acumulación de la toxina en el riñón y el cerebro altera el equilibrio osmótico de esos tejidos, y esos cambios degenerativos eventualmente causan fugas de proteínas del suero y células rojas de la sangre, ocasionando un edema masivo (7).

Estudios cristalográficos para la determinación de la estructura proteica de la toxina, en conjunto con análisis bioinformáticos, han permitido demostrar que la toxina épsilon posee una clara similitud estructural con la aerolisina, una toxina formadora de poro, producida por la bacteria Gram negativa *Aeromonas hydrophilia* (ver figura 2), a pesar de la baja identidad de secuencia proteica que comparten, de 13.9% (7).

Por otra parte, una condición característica de la toxina épsilon, que no comparte con las demás toxinas formadoras de poro, es su potente neurotoxicidad (5).

Además, se sospecha que la toxina épsilon podría ser transmitida en alimentos o agua contaminados, o por aerosoles (4).

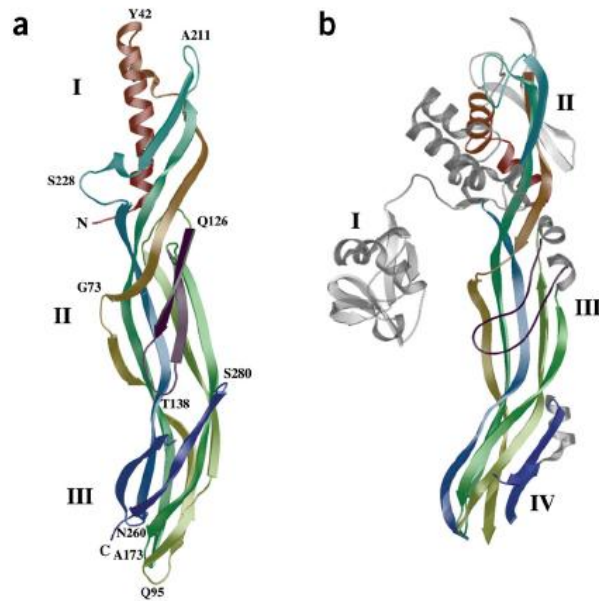


Figura 2. Representación gráfica tridimensional de las estructuras proteicas de las toxinas épsilon y aerolisina (7).

### 1.3. Infecciones causadas por la toxina épsilon

La toxina épsilon es causante de una enterotoxemia grave y rápidamente fatal. La prevención de esta enfermedad es crucial, ya que la muerte del animal infectado en ocasiones sobreviene dentro de las dos horas subsiguientes a la aparición de los síntomas (8). La enterotoxemia causada por *C. perfringens* de tipo D produce la enfermedad del riñón pulposo en ovejas, cabras y raramente en el ganado bovino y caballos jóvenes. La tasa de mortalidad puede ser del orden de 100%. Ninguna enfermedad es infecciosa, pero aparecen brotes esporádicos cuando se altera el equilibrio microbiano del intestino, por ejemplo después del tratamiento con antibióticos o debido a cambios en la dieta. La enfermedad del riñón pulposo se asocia a menudo con un cambio de una dieta pobre a una rica acompañado de una sobrealimentación excesiva. Dicha sobrealimentación causa que considerables cantidades de alimento rico en almidón no digerido pasen del rumen al intestino delgado. El entorno anaeróbico nutritivo que esto produce permite la multiplicación de *C. perfringens*, dando como resultado un aumento en las unidades formadoras de colonias que habitan el sistema gastrointestinal del animal, y por ende, altas concentraciones de toxina épsilon (9).

Generalmente, por causa de una infección mediada por esta toxina, se observa muerte súbita en corderos que se encontraban aparentemente en buenas condiciones. En algunos animales puede observarse excitación, falta de coordinación, convulsiones u opistótonos (postura característica de animales o humanos que sufren una infección por *Clostridium*). Es reconocible por la contracción continuada o rigidez de los músculos, de tal forma que el cuerpo queda curvado hacia atrás en forma de "C" invertida, con cabeza y patas hacia atrás (ver figura 3). Los corderos afectados pueden golpear sus cabezas o dar vueltas en círculos. En ocasiones se produce diarrea. En ovejas adultas, los

síntomas pueden incluir debilidad, falta de coordinación y convulsiones, con muerte dentro de las 24 horas posteriores a la infección (4).



**Figura 3. Cordero con opistótonos, muerto por infección clostridial.**

En cabras, la evolución de la enfermedad puede ser hiperaguda, aguda o crónica. Los signos clínicos varían desde diarrea, a veces sanguinolenta, hasta muerte súbita. Es común la presencia de signos neurológicos. Después de varias semanas puede producirse la muerte (4).

En terneros afectados levemente, puede observarse aletargamiento durante algunos días, en ocasiones seguido de recuperación. Los terneros afectados severamente desarrollan convulsiones, manía y ceguera, ocurriendo la muerte en pocas horas (4).

Actualmente existe información muy escasa acerca de los efectos de esta toxina sobre los humanos. Sin embargo, la extrapolación a partir de estudios con animales infectados experimentalmente indica que es posible que se presenten signos neurológicos o edema pulmonar (4).

#### **1.4. Lesiones post mortem**

El rumen y el abomaso por lo general contienen una gran cantidad de alimento. En el íleon puede observarse la alimentación no digerida. Los corderos jóvenes pueden tener algunas áreas hiperémicas en el intestino y líquido en el saco pericárdico. En animales más viejos, puede haber hemorragias en el miocardio, petequias y equimosis en la serosa del intestino y en los músculos abdominales. También es común la presencia de edema y congestión pulmonar. En ocasiones, en cabras es común observar enteritis hemorrágica o necrótica. En algunos animales, después de muertos, los riñones rápidamente se autolisan; aunque este signo no se presenta frecuentemente (4).

#### **1.5. Producción de vacunas para prevención de la infección causada por la toxina épsilon**

Existen diversas vacunas para la prevención de enterotoxemia por *C. perfringens*. Las vacunas están basadas en filtrados celulares o cultivos de células enteras tratados con formaldehído. Las vacunas

confieren un alto grado de protección a animales; sin embargo, se ha demostrado que la inmunogenicidad de la toxina épsilon en las preparaciones es variable, y que es preferible una vacuna más definida y consistente (9).

Generalmente, no se formulan vacunas específicas contra un tipo de toxina determinada, sino que se realizan preparados de diversas toxinas que confieren resistencia inmunológica al animal inmunizado, contra un grupo de toxinas clostridiales.

En nuestro país, una de las empresas líderes en la producción y comercialización de estas vacunas clostridiales es Laboratorios Santa Elena.

A continuación se describe brevemente el proceso de producción de vacunas clostridiales desarrolladas por esta empresa.

### **1.6. Producción de vacunas clostridiales por Laboratorios Santa Elena**

La producción de vacunas veterinarias en base a toxoides constituye hoy en día más del 50% de la facturación de Laboratorios Santa Elena y tiende a ser de las más importantes y con mayores perspectivas de expansión. Actualmente existe una fuerte presencia de estos productos en el mercado de Brasil, el mayor mercado bovino mundial, y próximamente ingresará a los mercados de Oceanía, Asia y África gracias a la nueva asociación a la multinacional Virbac.

Actualmente, Laboratorios Santa Elena obtiene los toxoides épsilon necesarios para la formulación de sus vacunas clostridiales por fermentación de cepas bacterianas de *Clostridium*, y consecutivos pasos de purificación de la toxina, basados en el filtrado y centrifugación del cultivo bacteriano; seguido por un paso final de tratamiento de la toxina épsilon con formaldehído, para su inactivación.

El procedimiento operacional que sigue la empresa para obtener la toxina épsilon con un nivel de pureza aceptable, genera rendimientos moderados, que podrían ser mejorados mediante la incorporación de tecnologías de purificación de proteínas de última generación a sus procesos, como el uso de soportes cromatográficos de afinidad o intercambio iónico. Debido al uso de esta metodología de purificación proteica poco eficiente, parte de la producción de la toxina épsilon se descarta en la masa celular, luego del paso obligado de centrifugación, lo cual ocasiona pérdidas para la empresa, en relación al ingreso potencial que generaría un aprovechamiento total de la toxina producida, con un grado de pureza mayor al 90%.

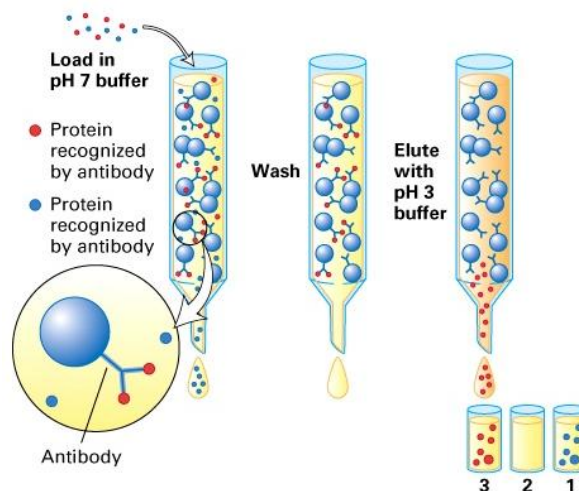
Por otra parte, la detección y cuantificación de toxina durante el proceso de producción, así como la evaluación de las respuestas serológicas en animales que fueron inmunizados con el toxoide épsilon, se llevan a cabo por medio de ensayos in vivo, consistentes en test de letalidad y ensayos dermonecróticos en roedores. Estos ensayos se caracterizan por ser altamente laboriosos, costosos y muchas veces difíciles de reproducir. Por lo tanto, en base a estos argumentos y a la tendencia actual de sustituir el uso de animales en los ensayos de laboratorio por métodos análogos in vitro, se ha propiciado la búsqueda de alternativas menos costosas, rápidas, fácilmente realizables y altamente reproducibles (10). Por este motivo, en este trabajo nos interesó realizar la purificación de anticuerpos anti toxina épsilon de *C. perfringens*, con la finalidad de que éstos puedan ser potencialmente usados en el desarrollo de un kit diagnóstico de carácter cualitativo y cuantitativo de la toxina.

## 1.7. Purificación de proteínas

### 1.7.1. Metodologías cromatográficas de última generación

La implementación de estas tecnologías por parte de Laboratorios Santa Elena, no solo podrán aportar mayores rendimientos en la producción sino que independizarían a la empresa del uso de costosas membranas de filtrado cuya importación en ocasiones retrasa la producción. Además, el desarrollo tecnológico podría extenderse a otros toxoides que están siendo producidos por sus laboratorios y también presentan niveles de pureza que pueden ser mejorados.

El uso de métodos cromatográficos a medida es una de las estrategias más usadas y efectivas para la purificación de proteínas (11-12). A nivel industrial el uso de estas técnicas para la adsorción selectiva de la proteína diana es altamente ventajoso (13). Por ejemplo, cuanto menor sea el porcentaje de proteínas no deseadas adsorbidas, menor será el tamaño de la columna o la cantidad de matriz cromatográfica necesaria para la purificación y por ende, menores serán los costos del proceso. Además, disminuyendo la posibilidad de adsorber proteínas contaminantes será más fácil adsorber selectivamente la proteína diana. Esta selectividad usualmente se alcanza a través de técnicas de cromatografía de afinidad (ver figura 4) (14).



**Figura 4. Representación gráfica de una cromatografía de afinidad**, con un soporte cromatográfico funcionalizado con anticuerpos. [18]

Las técnicas de cromatografía de afinidad consisten en el uso de soportes cromatográficos funcionalizados con moléculas que interaccionen de manera específica con el analito de interés. Por esto es común que en este tipo de tecnología, se utilicen anticuerpos para funcionalizar la superficie de los soportes cromatográficos.

Sin embargo, existe también lo que se conoce como soportes cromatográficos de intercambio iónico para la purificación de proteínas, que actúan adsorbiendo a las proteínas por interacciones iónicas multipuntuales sobre las cargas expuestas de ésta (ver figura 5).

Existe una gran ventaja en el uso de este método de purificación cromatográfica por sobre los demás, que recae en la posibilidad de revertir fácilmente la adsorción de las proteínas para liberarlas nuevamente en una solución, por el agregado de un buffer salino que aumente la fuerza iónica del medio y compita con la proteína por los sitios de unión al soporte.

A pesar de que un método de adsorción por intercambio iónico no parezca ser una estrategia válida para la purificación de una proteína determinada de forma selectiva, debido a la posibilidad de que puedan adsorberse otras proteínas contenidas en una muestra compleja (15); ha sido demostrado que mediante un diseño adecuado del soporte y controlando estratégicamente las condiciones en que se lleva a cabo la adsorción, es posible adsorber proteínas a soportes iónicos de manera selectiva (16).

Con el fin de diseñar un soporte cromatográfico selectivo para la purificación de una proteína de interés, se debe realizar un estudio de las propiedades bioquímicas de ésta (tamaño, pI, disponibilidad de residuos cargados en la superficie), y las condiciones de fermentación en las que fue producida (pH, fuerza iónica, temperatura, velocidad de agitación, entre otras).

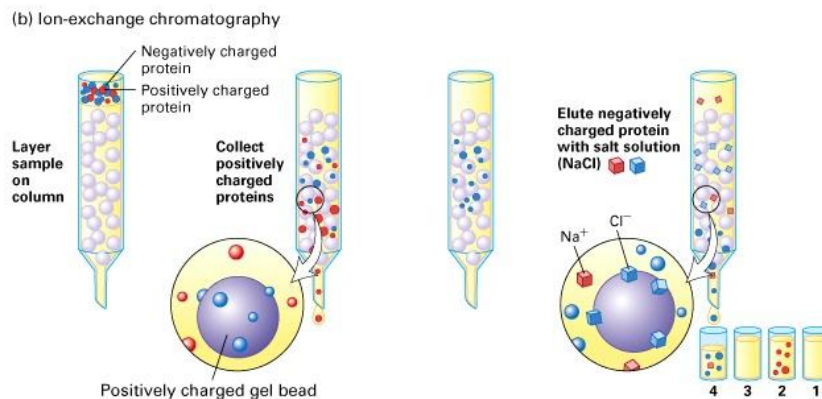


Figura 5. Representación gráfica de una cromatografía de intercambio iónico (18).

Para este caso en particular, la forma de implementar el uso de estos soportes cromatográficos a los procesos productivos de la toxina épsilon en Laboratorios Santa Elena, consistiría en incorporar al cultivo el derivado funcionalizado, una vez se haya alcanzado el punto máximo de producción de la toxina, para adsorberla. Luego se dejaría decantar el soporte con la toxina ya unida, para separarlo del resto de los componentes contaminantes del caldo de cultivo; y finalmente eluir la toxina por aumento de la fuerza iónica del medio, mediante el agregado de un buffer salino; o por la modificación del pH hasta su punto isoeléctrico.

En este trabajo en particular, se sintetizaron tres soportes diferentes, cada uno funcionalizado de una forma específica y con un fin determinado.

### 1.7.2. Soportes cromatográficos utilizados en este trabajo

En este trabajo, se testearon dos soportes cromatográficos diferentes, ambos sintetizados *de novo*, en el Laboratorio de Biotecnología de Universidad ORT Uruguay; con el objetivo de encontrar la

estrategia más conveniente, desde un punto de vista técnico y económico, para la purificación de la toxina épsilon. El tercer soporte se desarrolló con la intención de purificar anticuerpos anti toxina épsilon a partir de un suero hiperinmune.

El primero de los soportes evaluados, fue un soporte de intercambio aniónico, llamado monoaminoetil-N-aminoetil, también conocido como MANAE. Este soporte está constituido por micropartículas de agarosa, funcionalizadas químicamente con grupos amino cargados positivamente (17).

El segundo soporte cromatográfico evaluado, fue un derivado basado en micropartículas de agarosa funcionalizadas con grupos aldehído y quelatos de cobre, a los cuales se hizo reaccionar con anticuerpos comerciales específicos contra la toxina épsilon de *C. perfringens* para inmovilizarlos covalentemente. De esta forma se obtuvo como derivado final, un soporte cromatográfico de afinidad, funcionalizado con anticuerpos comerciales anti toxina épsilon.

El tercer soporte cromatográfico desarrollado, fue un derivado basado en micropartículas de agarosa, conocido con el nombre de Glioxil-agarosa, funcionalizado con toxina épsilon con alto grado de pureza.

Cabe destacar que, por una cuestión de conveniencia económica y menor dificultad de síntesis, existía mucho interés por que el método de purificación de la toxina basado en el uso del intercambiador iónico (MANAE) funcionara eficazmente y con altos rendimientos en cuando al nivel de pureza del producto obtenido.

### 1.8. Purificación de anticuerpos anti toxina épsilon

El desarrollo de un nuevo sistema de diagnóstico de carácter cualitativo y cuantitativo, que permitiera monitorear el proceso de producción de la toxina épsilon a lo largo del tiempo, para controlar y ajustar con mayor agudeza los parámetros del cultivo, y detener o promover el crecimiento bacteriano según se haya alcanzado el punto máximo de producción de la toxina o falte para ello, respectivamente, es de interés industrial.

En vistas de esta necesidad planteada, en el Laboratorio de Biotecnología de nuestra Universidad, se propuso un diseño racional de un kit diagnóstico, basado en la inmovilización de anticuerpos anti toxina épsilon, purificados a partir de un suero hiperinmune.

Las tecnologías propuestas fueron las siguientes:

**-Kit ELISA:** Ensayo inmunoenzimático, basado en la inmovilización de anticuerpos policlonales anti toxina épsilon de *C. perfringens* sobre los pocillos de la placa de ELISA, para que “atrapen” de forma selectiva la toxina de interés presente en una muestra compleja. De esta forma es posible separar por lavados el analito, del resto de la fracción contaminante; y finalmente revelar el ensayo mediante el uso de un segundo anticuerpo monoclonal conjugado a una enzima, que actúe en presencia de su sustrato para generar un producto con una coloración observable y medible.

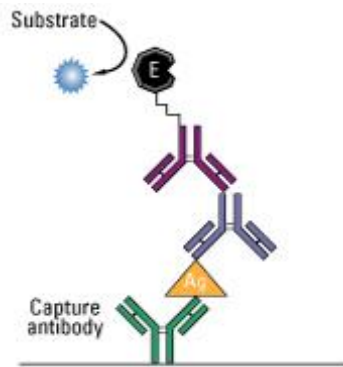


Figura 6. Representación gráfica de un ensayo de ELISA directo.

**-Kit basado en nanopartículas de oro:** Ensayo basado en el uso de nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpos anti toxina épsilon de *C. perfringens*; que permita detectar y cuantificar un amplio rango de concentraciones de analito directamente de la muestra, con un alto nivel de sensibilidad y especificidad. Aprovechando las ventajosas propiedades ópticas que poseen las nanopartículas de oro, puesto que el color que presentan en disolución se debe a su banda de absorción de plasmón de superficie, y la variación de esta banda, al disminuir la distancia entre partículas y formar agregados, por la interacción de los anticuerpos inmovilizados a su superficie con la toxina presente en la muestra, genera un cambio de color de la suspensión de oro coloidal en el espectro visible, la cual además de ser percibida a simple vista puede ser medida por espectrofotometría (ver figura 7).

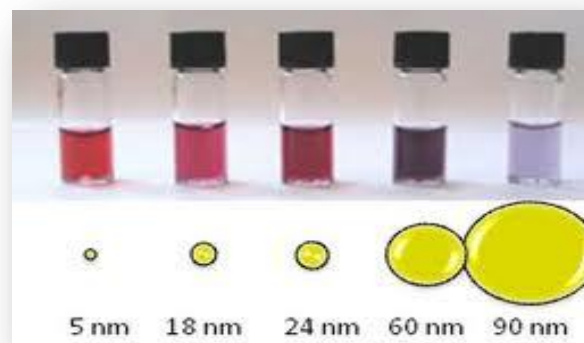


Figura 7. Soluciones de nanopartículas de oro con diferentes diámetros. Se observa cambio de color por el efecto de resonancia del plasmón de superficie.

A pesar de que Laboratorios Santa Elena puede acceder fácilmente a sueros hiperinmunes clostridiales, existe una dificultad inherente al trabajar con esta sustancia, puesto que los antisueros contienen una gran diversidad de proteínas y otros componentes contaminantes indeseables, y se conoce el hecho de que el desarrollo de un kit diagnóstico requiere necesariamente del uso de anticuerpos con un alto grado de pureza.

Por esta razón, fue necesario idear un método de purificación selectivo de los anticuerpos específicos contra la toxina épsilon, a partir de una muestra compleja como el suero hiperinmune.

Con este fin, se optó por inmovilizar la toxina épsilon purificada previamente a un soporte aldehído agarosa conocido con el nombre de Glioxil. Luego, el antisuero producido por Laboratorios Santa Elena podría ser incubado con el derivado sintetizado, bajo las condiciones necesarias para que los anticuerpos de interés interaccionen con la toxina inmovilizada, logrando la purificación de éstos.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

Desarrollar una tecnología económicamente rentable y técnicamente fácil de reproducir que permita purificar anticuerpos anti toxina épsilon de *C.perfringens* a partir de un suero hiperinmune, de forma selectiva; para ser utilizados posteriormente en el desarrollo de una metodología de análisis, de carácter cualitativo y cuantitativo, que permita monitorear el proceso de producción de la toxina épsilon de manera más eficiente.

### 2.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos del proyecto son los siguientes:

- Diseño racional de diferentes matrices cromatográficas para la purificación de toxina épsilon de *C.perfringens*.
- Purificación de toxina épsilon de *C.perfringens*, con un grado de pureza mayor o igual al 90%, utilizando al menos una de las matrices cromatográficas sintetizadas.
- Inmovilización de la toxina épsilon purificada a derivado de agarosa, para ser usado como matriz cromatográfica en la purificación de anticuerpos anti toxina épsilon de *C.perfringens*, a partir de un suero hiperinmune.
- Purificación de anticuerpos anti toxina épsilon de *Clostridium perfringens*, a partir de un suero hiperinmune.

## 3. Materiales

### 3.1. Cuantificación de proteínas por método BCA:

- Ácido bicinconínico de Sigma Aldrich.
- Solución de sulfato de cobre de Sigma Aldrich.

### 3.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):

- Agua destilada
- Acrilamida 30% de Sigma Aldrich.
- Buffer Tris 1.5 M (pH 8.8) de Sigma Aldrich (para el gel concentrador).
- Buffer Tris 1.0 M (pH 6.8) de Sigma Aldrich (para el gel separador).
- SDS 10% de Sigma Aldrich.
- Persulfato de amonio 10% de Sigma Aldrich.
- TEMED de Sigma Aldrich.

### 3.3. Síntesis de Glioxil:

- Agarosa 6BCL de Sigma Aldrich.
- Agua destilada.
- Hidróxido de sodio de Sigma Aldrich.
- Borohidruro de sodio de Sigma Aldrich.
- Glicidol de Sigma Aldrich.
- Periodato de sodio de Sigma Alrich.

### 3.4. Síntesis de MANAE:

- Glioxil.
- Etilendiamina de Sigma Aldrich.
- Borohidruro de sodio de Sigma Aldrich.
- Acetato de sodio de Sigma Aldrich.
- Borato de sodio de Sigma Aldrich.
- Gliceril-agarosa, cedido por el grupo de investigación del profesor José Manuel Guisán, CSIC España (para síntesis de MANAE Lote III).

### 3.5. Purificación de toxina épsilon e Inmovilización de toxina épsilon a Glioxil:

- Cultivo de *C.perfringens* tipo D, filtrado (0.2 µm), proveído por Laboratorios Santa Elena.

### 3.6. Síntesis de Glioxil/IDA – Ac:

- Glioxil IDA/Cu, sintetizado por la Msc. Mariana Ferrari.
- Fragmentos Fab de anticuerpos anti toxina épsilon de *Clostridium perfringens*, de la empresa NIBSC.

- Imidazol de Sigma Aldrich
- EDTA de Sigma Aldrich
- Bicarbonato de sodio de Sigma Aldrich.
- Borohidruro de sodio de Sigma Aldrich.

### **3.7. Purificación de anticuerpos anti toxina épsilon de C.perfringens:**

- Suero hiperinmune, proveído por Laboratorios Santa Elena.

## 4. Metodología

### 4.1. Análisis bioinformático de la toxina épsilon de *C. perfringens*

En primer lugar, se realizó un estudio bioinformático de la toxina épsilon, para conocer acerca de su estructura proteica y composición aminoacídica.

Para esto se ubicó la entrada correspondiente a la toxina épsilon de *C. perfringens*, bajo el código 1UYJ, en la base de datos de estructuras moleculares tridimensionales del RCSB Protein Data Bank; se descargó el archivo en formato “.pdb” y se analizó mediante el uso de la herramienta informática de visualización molecular VMD, de la Universidad de Illinois.

De esta forma, se examinó la presencia de residuos de Aspartato, Glutamato y Lisina expuestos en la superficie de la proteína. Esto para conocer la densidad de carga superficial mayoritaria de la toxina, y decidir si la adsorción planteada de la toxina a un soporte de intercambio iónico cargado positivamente es la mejor estrategia.

La búsqueda en particular de los tres tipos de residuo mencionados se realizó bajo el conocimiento de que éstos pertenecen al grupo de residuos con carga en su cadena lateral (a pH fisiológico = 7.35-7.45, Glutamato y Aspartato tienen carga negativa, Lisina tiene carga positiva) y por lo tanto pueden exponerlas a la superficie de la proteína.

### 4.2. Síntesis de soporte cromatográfico de intercambio iónico para la purificación de toxina épsilon

#### 4.2.1. Síntesis de MANAE

Para la síntesis del soporte cromatográfico monoaminoetil-N-aminoetil (MANAE), se seleccionó la agarosa 6BCL comercial, debido a que presenta ciertas características que la hacen propicia para el objetivo planteado; como son presentar una gran resistencia mecánica, alta estabilidad a los cambios de pH, resistencia frente a agentes sanitizantes y un tamaño de poro adecuado para el peso molecular de la toxina épsilon.

El primer paso para la síntesis de MANAE consistió en lavar la agarosa, de forma minuciosa y reiterada, con agua destilada, con el fin de eliminar completamente el etanol en que se encontraba suspendida para su preservación.

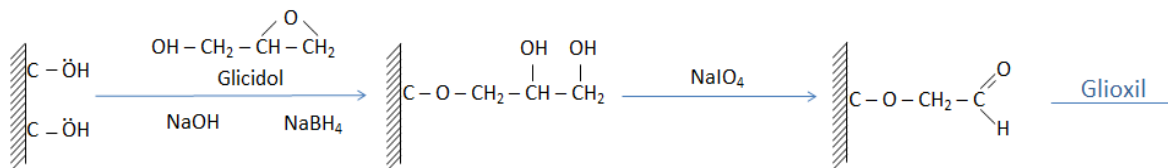
Una vez realizados los lavados, los siguientes pasos fueron resuspender 26 g de agarosa en 7.5 mL de agua destilada y agregar, en frío, 0.85 g de NaOH previamente disueltos en 12.5 mL de agua destilada, además de 0.36 g de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ). De esta forma, se estarían activando los grupos hidroxilo (-OH) reactivos que se encuentran en los carbonos número 6 de las moléculas de galactosa que conforman la agarosa.

Posteriormente, se agregaron 9 mL de glicidol a la solución, por goteo, y se dejó incubar entre 15-18 horas a temperatura ambiente. Una vez hecho esto, se realizó un lavado del preparado con agua destilada para eliminar el exceso de glicidol que no hubiera reaccionado.

Finalmente, se preparó una solución de 0.79 g de periodato de sodio ( $\text{NaIO}_4$ ) en 37 mL de agua destilada (100 mM de  $\text{NaIO}_4$ ), en la cual se incubó el preparado anterior, durante 2 horas a temperatura ambiente, antes de ser filtrado.

En este punto se tomaron muestras del periodato de sodio ofrecido y el filtrado luego de las 2 horas, para ser analizadas por espectrofotometría, a una longitud de onda de 318 nm, y evaluar si hubo consumo del mismo, lo cual sería tomado como control positivo de la síntesis del soporte.

De esta forma, se obtuvo un soporte de agarosa cargado con grupos aldehídos, conocido con el nombre de Glioxil (ver figura 8).



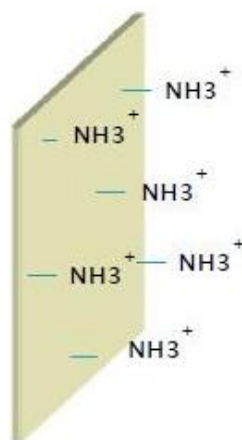
**Figura 8. Química de la síntesis de Glioxil agarosa.**

A partir de este soporte, se procedió con la síntesis del MANAE; mediante la activación de los grupos aldehídos del Glioxil, con etilendiamina (EDA). Para esto se incubaron 20 g de Glioxil con 180 mL de EDA 1M a pH 10.05, durante 2 horas, a temperatura ambiente.

Posteriormente, se agregó 2 g de  $\text{NaBH}_4$  y se mantuvo el preparado en agitación durante otras 2 horas, a temperatura ambiente.

Para finalizar, se realizaron tres lavados del soporte. El primero de ellos con 200 mL de buffer acetato de sodio 100 mM a pH 4; el segundo con 200 mL de buffer borato de sodio 100 mM a pH 9; y el tercer y último lavado con 500 mL de agua destilada.

Al finalizar la síntesis se obtuvo una matriz aminada, cargada positivamente (ver figura 9).



**Figura 9. Esquema de la superficie del MANAE. Se representan los grupos aminos cargados positivamente.**

### 4.3. Purificación de toxina épsilon por cromatografía de intercambio iónico

#### 4.3.1. Evaluación de la unión de la toxina épsilon de *C. perfringens* a MANAE

El ensayo de adsorción de la toxina consistió en incubar 1 g de MANAE con 6 mL de toxina épsilon, durante 18 horas, en agitación y a temperatura ambiente.

Según datos de experimentos previos de adsorción y elución del toxoide épsilon realizados en el Laboratorio de Biotecnología de Universidad ORT Uruguay, obtenido mediante la inactivación con formaldehído de la toxina épsilon; se determinó esta relación MANAE-toxina como la más adecuada para adsorber la totalidad del toxoide ofrecido. Por ende, al trabajar con la toxina activa, se trató de determinar si bajo las mismas condiciones de trabajo se podría obtener rendimientos similares a los obtenidos con el toxoide.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación especificado, se filtró el sobrenadante de la adsorción, para obtener el derivado unido a la toxina.

Finalmente, se procedió con la etapa de elución de la toxina que fue adsorbida por el derivado; mediante la incubación del mismo en 2 mL de buffer fosfato de sodio (NaP), 25 mM, pH 7 + 1M de NaCl, en agitación, a temperatura ambiente, por 90 minutos.

Durante este procedimiento se tomaron muestras de la toxina ofrecida, el sobrenadante de la adsorción y el sobrenadante de la elución (ver figura 10) para ser analizadas por el método de cuantificación de proteínas BCA y electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia del buffer reductor SDS (SDS-PAGE) (bajo los parámetros: 120 V, 25 mA, 50 W). Todos los geles SDS-PAGE se sintetizaron al 10% y fueron teñidos con azul de Coomassie.

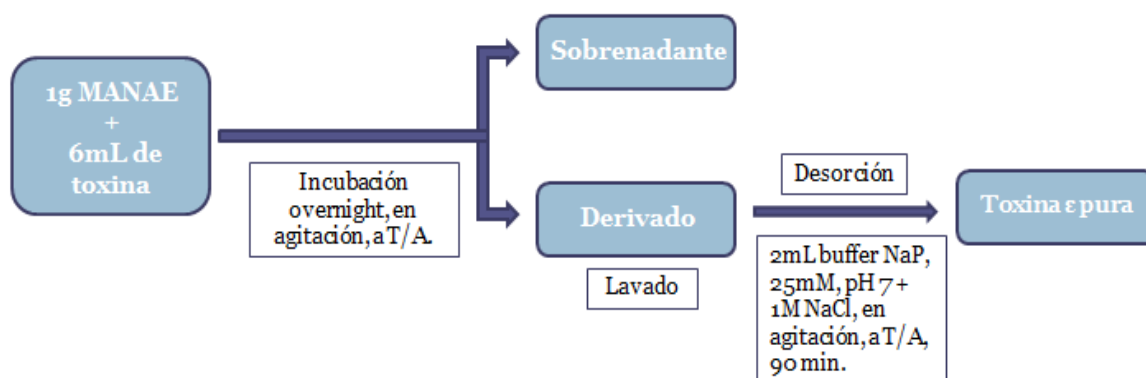


Figura 10. Esquema del diseño experimental para los ensayos de adsorción y elución de la toxina épsilon de *C. perfringens* al MANAE.

## 4.4. Síntesis de soporte cromatográfico de afinidad para la purificación de toxina épsilon

### 4.4.1. Síntesis de soporte Glioxil IDA-Ac

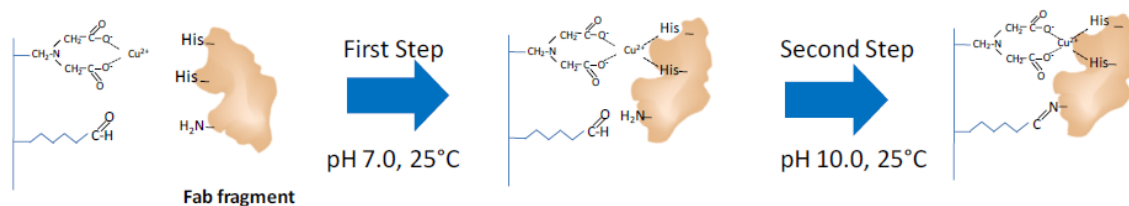
Para la síntesis de este soporte se utilizó un preparado comercial de fragmentos Fab, de anticuerpos anti toxina épsilon que fueron digeridos con la enzima papaína.

Las inmovilización de anticuerpos comerciales anti-toxina  $\epsilon$  de *C. perfringens* se llevó a cabo incubando 5 mL de una dilución 1/20 de anticuerpos anti-toxina  $\epsilon$  ("*Clostridium Perfringens Epsilon Antitoxin*", de la empresa NIBSC) con 0,5 g del soporte heterofuncional (soporte funcionalizado con al menos dos grupos reactivos) Glioxil/IDA-Cu, sintetizado previamente por la Msc. Mariana Ferrari, y una concentración de 1 mM de Imidazol, a pH 7.0, durante 24 horas, luego de las cuales se eluyó el sobrenadante de la inmovilización.

En este punto, los anticuerpos estaban unidos por interacción quelante de sus residuos de Histidina expuestos, al catión  $\text{Cu}^{2+}$  presente en la matriz de agarosa funcionalizada.

Con el fin de lograr una unión estable (covalente), se llevó a cabo una segunda reacción más lenta, aumentando el pH de la solución a 10.0, con un buffer bicarbonato de sodio 0,1 M, durante 2 horas, para activar los residuos de Lisina de los anticuerpos y permitir que sus grupos amino reaccionasen con los grupos aldehídos del soporte, generando bases de Schiff. Posteriormente, se agregó EDTA 0,5 M (pH 10) a la solución, durante 30 minutos, para eliminar por quelación el cobre del soporte y evitar así que se den luego uniones inespecíficas de la toxina  $\epsilon$  a la matriz.

Luego de un paso de filtración, en el cual se eliminó el sobrenadante de la suspensión, se agregó una solución con una concentración de 1mg/mL de borohidruro de sodio en buffer bicarbonato de sodio (pH 10), durante 1 hora, para reducir las bases de Schiff y favorecer la formación de enlaces covalentes (ver figura 11).



**Figura 11. Soporte heterofuncional para la inmovilización de fragmentos Fab.** Grupos funcionales en partículas de agarosa (4BCL): Grupos quelantes metálicos iminodiacéticos y aldehídos.

Durante la primer etapa de inmovilización de los fragmentos de anticuerpos al soporte, se tomaron muestras a los 15, 30, 45, 60 y 150 minutos y una última muestra pasadas las 24 horas de incubación, con el fin de analizarlas y determinar el tiempo necesario para obtener una máxima unión de fragmentos Fab.

Además, se tomaron muestras del derivado, antes y después de inducir la segunda reacción más lenta, para confirmar que se hubieran generado las interacciones covalentes entre los fragmentos de Fab y el soporte.

Todas las muestras tomadas fueron analizadas por el método de cuantificación de proteínas BCA y SDS-PAGE (bajo los parámetros: 120 V, 25 mA, 50 W).

#### **4.5 Purificación de toxina épsilon por cromatografía afinidad**

##### **4.5.1. Unión de la toxina**

El ensayo de unión de la toxina se realizó incubando 0,2g del derivado, funcionalizado con fragmentos Fab de anticuerpos anti toxina épsilon, con 2mL de toxina épsilon.

Durante la incubación se tomaron muestras del sobrenadante y derivado a diferentes tiempos (15, 30, 60, 120 minutos y 24 horas) con el fin de seguir el proceso de unión de la toxina al soporte.

Las muestras se analizaron por el método de cuantificación de proteínas BCA y SDS-PAGE (bajo los parámetros: 120 V, 25 mA, 50 W).

##### **4.5.2. Elución de la toxina**

Dos estrategias diferentes fueron probadas para eluir la toxina unida al soporte. Una de ellas consistió en aumentar la fuerza iónica del sistema, mediante el uso de buffer fosfato de sodio 25mM a pH 7 y 1M NaCl. La segunda estrategia consistió en modificar el pH del sistema hasta que fuese igual al punto isoeléctrico de la toxina (5.4), para lo cual se utilizó un buffer acetato de sodio 25 mM a pH 5.4.

Cada ensayo se realizó incubando 200 mg del derivado unido a la toxina, con 2 mL de alguno de los buffers de elución anteriormente mencionados.

Las fracciones eluidas se analizaron por BCA y SDS-PAGE, mientras que los derivados tratados fueron analizados solamente por SDS-PAGE.

#### **4.6. Síntesis de soporte cromatográfico de afinidad para la purificación de anticuerpos anti toxina épsilon de *C.perfringens***

##### **4.6.1. Inmovilización de toxina épsilon a Glioxil agarosa**

Una vez se hubo purificado la toxina épsilon de *C. perfringens tipo D*, se llevó a cabo el proceso de inmovilización de ésta a Glioxil agarosa, con el fin de utilizar el derivado como soporte cromatográfico con el cual purificar anticuerpos anti-toxina épsilon, a partir de un suero hiperinmune producido por Laboratorios Santa Elena.

Se preparó Glioxil, según el protocolo descrito en "4.2.1.". Posteriormente se incubó 2 g de Glioxil agarosa con 7 mL de toxina épsilon, gel filtrada y eluida en un buffer bicarbonato de sodio 0.1 M, a pH 10; durante toda la noche, a 4°C.

Se agregó 7 mg de  $\text{NaBH}_4$  para reducir las bases de Schiff y promover la formación de enlaces covalentes entre la toxina y el soporte; y se volvió a incubar en agitación, durante 30 minutos.

Finalmente, se realizó un lavado exhaustivo del preparado, con buffer NaP 25 mM , a pH 7, para eliminar el exceso de borohidruro de sodio.

En este ensayo se tomaron muestras de la toxina ofrecida y el sobrenadante de la inmovilización, para ser analizadas por el método de cuantificación de proteínas BCA y SDS-PAGE (bajo los parámetros: 120 V, 25 mA, 50 W).

#### **4.7. Purificación de anticuerpos anti toxina $\epsilon$ de *C. perfringens***

Para el ensayo de purificación de los anticuerpos anti toxina  $\epsilon$ , se realizaron dos experimentos en paralelo. Uno de ellos utilizando anticuerpo comercial (4.2.2., el mismo que se utilizó en el desarrollo del soporte cromatográfico de afinidad para la purificación de toxina  $\epsilon$ ), y el otro con un suero hiperinmune proveído por Laboratorios Santa Elena.

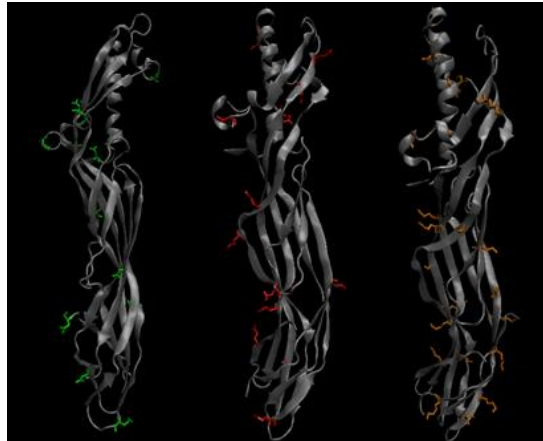
Se preparó una dilución 1/20 de cada una de las muestras, en buffer NaP, 25 mM, a pH 7. Luego, se incubó por separado 1 g de Glioxil con 2,5 mL de la dilución de anticuerpo o antisuero, durante 2 horas, a temperatura ambiente.

Finalmente, se llevó a cabo la elución de las fracciones de anticuerpo unidas, por modificación del pH del medio hasta el punto isoelectrico de la toxina  $\epsilon$ . Se tomaron muestras de las diluciones de anticuerpo ofrecidas, los sobrenadantes luego de la unión al derivado, y finalmente los eluidos correspondientes; para ser analizados por el método de cuantificación de proteínas BCA y SDS-PAGE (bajo los parámetros: 120 V, 25 mA, 50 W).

## 5. Resultados y Discusión

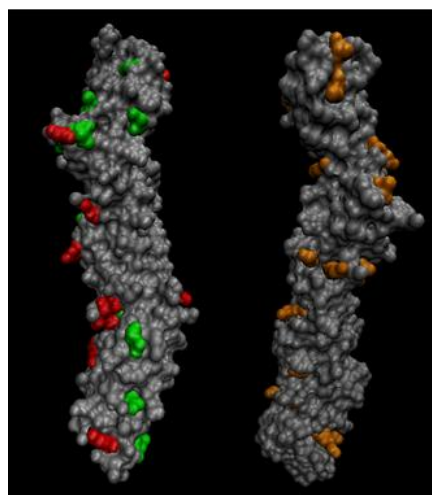
### 5.1 Análisis bioinformático de la toxina épsilon de *C.perfringens*

El estudio de los residuos cargados expuestos a la superficie de la toxina, demostró que existe una mayor cantidad de Lisinas (con carga positiva), que de cada uno de los otros dos residuos estudiados, es decir Glutamato y Aspartato (con carga negativa) (ver figura 12). Sin embargo, la suma de las cargas negativas de estos últimos, es mayor que la cantidad de cargas positivas de las Lisinas expuestas (ver figura 13).



**Figura 12. Identificación de residuos cargados en la estructura terciaria de la toxina épsilon.** Aspartato (verde), Glutamato (rojo), Lisina (naranja). Se observa una mayor cantidad de residuos de Lisina que de Glutamato o Aspartato.

Por lo tanto, en vista de que la proteína expone una mayor cantidad de cargas negativas que positivas, es acertado sugerir que la estrategia planteada, de adsorber la toxina a un soporte cromatográfico de intercambio aniónico para su purificación, es válida.



**Figura 13. Comparación de residuos cargados negativamente vs residuos cargados positivamente.** Se observa como la suma de cargas de Aspartato (verde) más Glutamato (rojo), es mayor que la cantidad de cargas de Lisina (naranja).

## 5.2. Síntesis de soportes cromatográficos para la purificación de toxina épsilon

### 5.2.1. Síntesis de MANAE

El resultado del análisis de las muestras de periodato de sodio, por espectrofotometría a 318 nm, demostró que hubo consumo de periodato de sodio luego de ser ofrecido al soporte que se estaba sintetizando; por lo tanto, se pudo inferir que la síntesis del Glioxil ocurrió de forma exitosa.

Con respecto a la segunda etapa de la síntesis del MANAE, no se puede asegurar que la síntesis haya ocurrido exactamente según lo esperado, esto es, que la superficie del derivado se halle recubierta con 350  $\mu$ moles de grupos reactivos amino; ya que no se realizó ningún ensayo de detección y cuantificación de estos grupos.

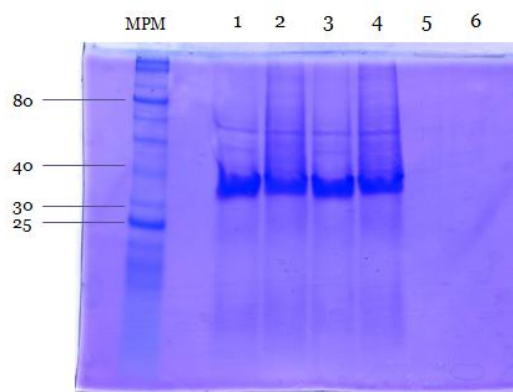
## 5.3. Purificación de toxina épsilon por cromatografía de intercambio iónico

### 5.3.1. Evaluación de la unión de la toxina épsilon al MANAE Lote I

En este punto cabe destacar el hecho de que, en una primera instancia, se realizaron dos ensayos de adsorción y elución en paralelo, para comparar el comportamiento de dos lotes diferentes de toxina al ser incubadas con el MANAE. Esto, debido a que las dos botellas de cultivo de *C. perfringens* filtrado, facilitadas por Laboratorios Santa Elena, contenían líquidos de coloración marrón con tonalidades notoriamente diferentes.

El primer ensayo de adsorción y elución de la toxina épsilon de ambos lotes, se llevó a cabo utilizando un soporte MANAE Lote I. El resultado de este experimento demostró que el soporte no logró unir cantidades significativas de toxina (ver figura 12). Esto no coincide con trabajos previos realizados en el Laboratorio de Biotecnología de Universidad ORT, donde se lograba una unión del 90% de la toxina épsilon, utilizando MANAE bajo estas mismas condiciones experimentales. Por ende, se decidió sintetizar MANAE nuevamente; para descartar la posibilidad de que el soporte se encontrara en mal estado.

Además, se observó que el comportamiento de ambos lotes de toxina fue el mismo, a pesar de que se veían diferentes.

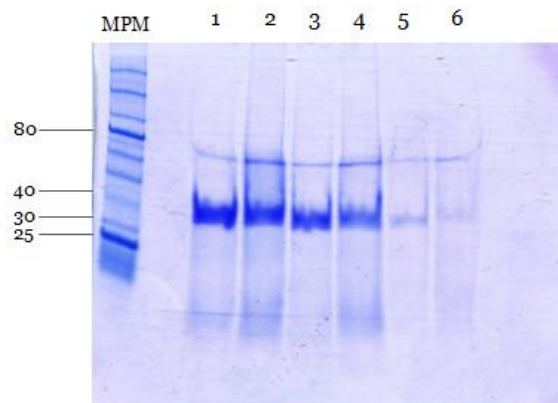


**Figura 12. Evaluación de la unión de toxina épsilon de dos lotes diferentes de cultivo de *C. perfringens*, a MANAE Lote I. 1) Toxina ofrecida del lote A; 2) Toxina ofrecida del lote B; 3) Sobrenadante de la adsorción del lote A; 4) Sobrenadante de la adsorción del lote B; 5) Elución de la toxina del lote A; 6) Elución de la toxina del**

### 5.3.2. Evaluación de la unión de la toxina épsilon al MANAE Lote II

El ensayo de adsorción y desorción de la toxina, contenida en ambos lotes, al MANAE Lote II, arrojó resultados desfavorables, puesto que el soporte no logró unir cantidades significativas de toxina, lo cual no concuerda con los resultados preliminares ya descritos. Como puede observarse en la imagen de la electroforesis de este experimento (ver figura 13), las bandas de los carriles 5 y 6, correspondientes a las fracciones de toxina eluida de los soportes, son sumamente tenues; lo cual indica que existió algún impedimento por el cual la toxina ofrecida no pudo unirse al MANAE como se esperaba.

Además, se observó nuevamente que el comportamiento de ambos lotes de toxina utilizados fue exactamente igual.



**Figura 13. Evaluación de la unión de toxina épsilon de dos lotes diferentes de cultivo de *C. perfringens*, a MANAE Lote II 1) Toxina ofrecida del lote A; 2) Toxina ofrecida del lote B; 3) Sobrenadante adsorción toxina del lote A; 4) Sobrenadante adsorción toxina del lote B; 5) Elución toxina del lote A; 6) Elución toxina del lote B.**

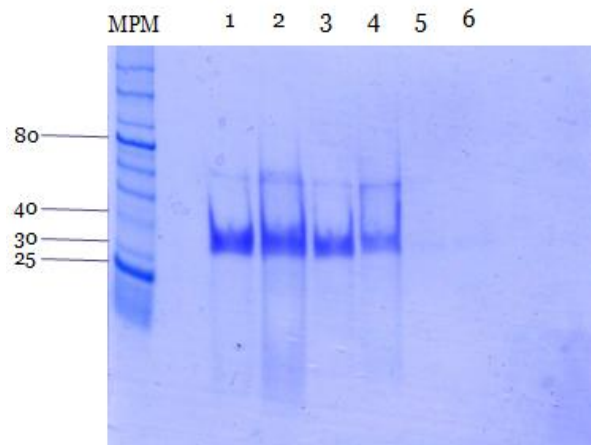
### 5.3.3. Evaluación de la unión de la toxina épsilon al MANAE Lote III

Para intentar reproducir los resultados previos obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología de Universidad ORT Uruguay, se sintetizó nuevamente MANAE (Lote III), pero esta vez partiendo desde un paso intermedio; utilizando un soporte Gliceril-agarosa, que es el soporte que se obtiene en el paso previo a la obtención de Glioxil-agarosa por el agregado de periodato de sodio.

Por lo tanto, se siguió el protocolo de síntesis desde ese punto, y se obtuvo un nuevo lote de MANAE, con el cual se repitió el ensayo de adsorción y elución de la toxina.

En este ensayo, ocurrió nuevamente lo que en los dos ensayos anteriores. Es decir, que los niveles de adsorción de toxina al MANAE fueron excesivamente bajos (ver figura 14).

Una vez más, se observó que los dos lotes diferentes de toxina utilizados arrojaron los mismos resultados. Por lo cual se concluyó que su contenido era el mismo, y a partir de aquí se continuó trabajando solamente con uno de estos lotes.



**Figura 14. Evaluación de la unión de la toxina épsilon a MANAE Lote III.** 1) Toxina ofrecida del lote A; 2) Toxina ofrecida del lote B; 3) Sobrenadante adsorción toxina del lote A; 4) Sobrenadante adsorción toxina del lote B; 5) Elución toxina del lote A; 6) Elución toxina del lote B.

#### 5.3.4. Evaluación de la unión de la toxina épsilon al MANAE Lote IV

Con el motivo de explorar si alguno de los materiales utilizados para la síntesis del MANAE podría encontrarse en mal estado, se decidió llevar a cabo una nueva síntesis (MANAE Lote IV), utilizando un nuevo EDA comercial, pues se sospechó del posible deterioro del EDA utilizado en las primeras síntesis. Esto, partiendo de la base de que el Glioxil agarosa se preparó correctamente, ya que se comprobó analíticamente que hubo consumo de periodato de sodio durante su síntesis.

Por lo tanto, se repitió el ensayo de adsorción y elución con la toxina.

Una vez más, la cantidad de toxina adsorbida al soporte fue muy escasa (datos no mostrados) en relación a los resultados esperados.

A partir de este punto, se continuó trabajando con el MANAE Lote IV en los siguientes ensayos (5.3.5.; 5.3.6.; 5.3.7.; 5.3.8.).

#### 5.3.5. Evaluación de la purificación de toxina épsilon en condiciones controladas de pH

Como consecuencia de lo anteriormente presentado, se figuró la posibilidad de que la causa del impedimento en la unión de la toxina al soporte se debiera a que ésta se encontrara en condiciones inadecuadas para su adsorción. Por esto, se decidió trabajar sobre el cultivo de *C.perfringens D* filtrado, que contenía a la toxina, para asegurar las condiciones óptimas necesarias para obtener altos rendimientos en la adsorción de la toxina al MANAE.

De esta manera, conociendo que el MANAE contiene grupos amino cargados positivamente en su superficie, y que por lo tanto, era necesario que la toxina épsilon estuviera cargada de forma negativa para interactuar con el soporte; se decidió aumentar el pH en el sobrenadante del cultivo celular, hasta un nivel de 8.0 (es decir, por encima del punto isoeléctrico de la toxina épsilon,  $pI =$

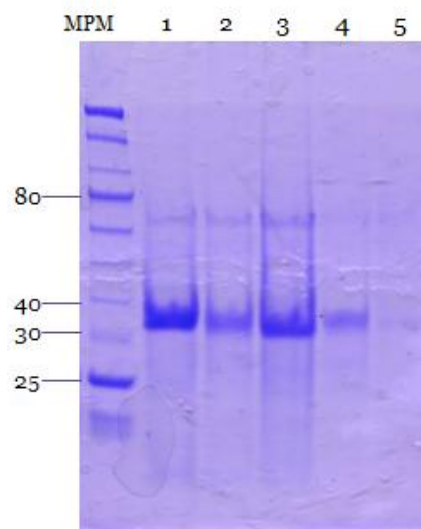
5.36), previo a su incubación con el derivado, para asegurar que las cargas expuestas en la toxina tuvieran la polaridad necesaria para que se diera lugar a la adsorción requerida.

Por otro lado, para tener un control negativo de la adsorción de la toxina al derivado, una fracción del cultivo mencionado fue alterada, de forma tal de que su pH fuera igual a 5.0, es decir, que se ubicara por debajo del punto isoeléctrico de la toxina, para asegurar que sus cargas expuestas tuvieran polaridad negativa, y que por lo tanto ésta no se uniera al soporte.

Una vez hecho esto, se llevó a cabo el ensayo de adsorción y elución de las fracciones de cultivo con diferentes pH, esperando así que la toxina que se encontraba en un medio con pH 8.0 se adsorbiera a la superficie del MANAE por interacción de sus cargas negativas con las cargas positivas del soporte; y por otro lado, que la toxina con un pH de 5.0, cargada positivamente, fuese repelida por las cargas positivas de éste.

Sin embargo, al contrario de lo que se esperaba, la fracción de toxina que debía unirse al soporte no lo hizo, mientras que aquella que no debía hacerlo si se adsorbió a éste (ver figura 15).

Este ensayo se realizó por segunda vez para descartar la posibilidad de que se hubiese sembrado el gel de forma errada. Sin embargo, se repitió el resultado de la primera vez.



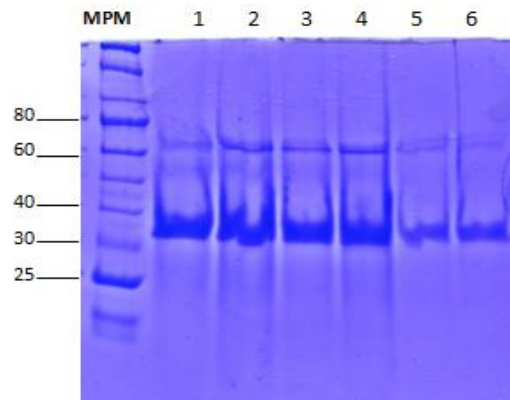
**Figura 15. Evaluación de la unión de la toxina epsilon a MANAE Lote IV, a pH 8.0 y pH 5.0. 1) Toxina ofrecida; 2) Sobrenadante de la adsorción, pH 5.0; 3) Sobrenadante de la adsorción, pH 8.0; 4) Elución de la toxina, pH 5.0; 5) Elución de la toxina pH 8.0.**

### **5.3.6. Evaluación de la unión de la toxina epsilon en buffer fosfato, en condiciones controladas de pH**

Debido al comportamiento extraño evidenciado entre las cargas del soporte y las toxinas a diferentes pH, se propuso la hipótesis de que existiesen altas concentraciones de sales en el medio donde se encontraba suspendida la toxina, que pudieran estar afectando las interacciones por cargas entre ésta y el soporte.

Se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño para realizar un cambio de buffer del medio de la toxina y eliminar así el exceso de sales. Se utilizó buffer fosfato de sodio 25 mM, a pH 7.

Los resultados obtenidos esta vez fueron, por un lado, más alentadores que los anteriores, pues en las fracciones de toxina eluida pudo observarse que hubo un aumento en el rendimiento de adsorción de la toxina. Por otro lado, no dejó de ser inesperado y desconcertante el hecho de que la toxina suspendida en un medio con pH 5.0 también se estuviera uniendo al MANAE, cuando no debería de hacerlo (ver figura 16).



**Figura 16. Evaluación de la unión de la toxina epsilon en buffer fosfato a MANAE Lote IV, a pH 8.0 y pH 5.0. 1) Toxina ofrecida, pH 5.0, gel-filtrada; 2) Toxina ofrecida, pH 8.0, gel-filtrada; 3) Sobrenadante de la adsorción, pH 5.0; 4) Sobrenadante de la adsorción, pH 8.0; 5) Elución de la toxina, pH 5.0; 6) Elución de la toxina, pH 8.0.**

### 5.3.7. Optimización de la relación MANAE-toxina a utilizar

En vista de los resultados obtenidos hasta ese momento, se planteó encarar el problema desde una posición diferente.

Habiendo descartado un error en la síntesis del MANAE, un problema de interacción por una densidad de cargas mayoritariamente negativas sobre la toxina, y la presencia de sales que interfirieran con la adsorción de ésta al soporte; se decidió modificar la relación MANAE-toxina para estudiar el comportamiento de ambos agentes frente a las diferentes condiciones establecidas.

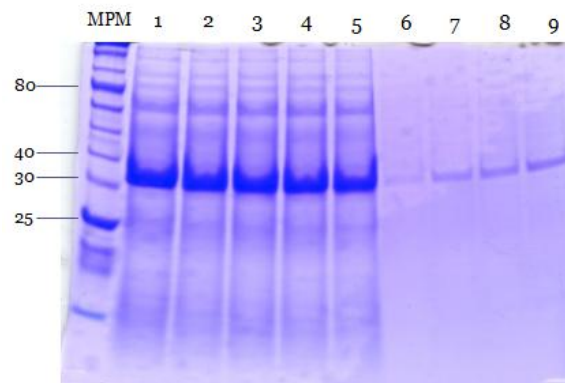
Por esto, se estudiaron las siguientes relaciones: 0.25 g de MANAE + 1.5 mL de toxina epsilon (esto es una relación 1:6, tal cual se había estado trabajando hasta el momento); 0.5 g de MANAE + 1.5 mL de toxina (relación 1:3); 0.75 g de MANAE + 1.5 mL de toxina (relación 1:2); y 1.0 g de MANAE + 1.5 mL de toxina (relación 2:3). La incubación esta vez se realizó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Luego de la incubación se realizó un lavado con buffer NaP, a pH 7.0, 20 mM, con un volumen igual al de toxina ofrecida; y se eluyó la toxina adsorbida por aumento de la fuerza iónica del medio, mediante el agregado de buffer NaP pH 7, 20 mM + 1M NaCl, y su incubación durante 30 minutos.

Esta vez, los resultados mostraron que una mayor cantidad de toxina fue adsorbida cuando se utilizó 1.0 g de MANAE en el ensayo, y una menor cantidad fue adsorbida cuando se utilizó la relación 1:6

que se había estado utilizando anteriormente. Es decir, que frente a un aumento en la cantidad de MANAE utilizado, mientras se mantuviese invariable el volumen de toxina ofrecida, también aumentaba la cantidad de toxina que se adsorbía al soporte.

De todas formas, el rendimiento estuvo muy por debajo de lo esperado, en cualquiera de las relaciones ensayadas (ver figura 17); y por algún motivo, la cantidad de soporte necesario para la purificación de la toxina fue superior a los previamente utilizados en los ensayos preliminares.



**Figura 17. Evaluación de la unión de la toxina épsilon bajo diferentes relaciones MANAE-toxina. 1) Toxina ofrecida; 2) Sobrenadante de adsorción, relación 1:6; 3) Sobrenadante de adsorción, relación 1:3; 4) Sobrenadante de adsorción, relación 1:2; 5) Sobrenadante de adsorción, relación 2:3; 6) Elución, relación 1:6; 7) Elución, relación 1:3; 8) Elución, relación 1:2; 9) Elución, relación 2:3.**

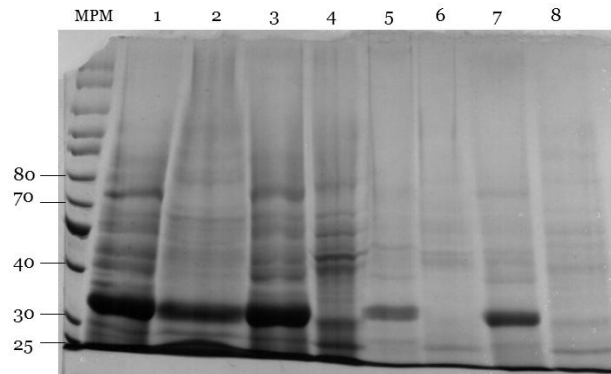
### 5.3.8. Evaluación de interferencia en la unión de la toxina épsilon por presencia de antiespumante

Debido a los resultados obtenidos hasta este punto, se sospechó que alguno de los ingredientes del cultivo debía de estar interfiriendo en la interacción de las cargas de la toxina con las cargas del soporte.

Gracias a información proveída por Laboratorios Santa Elena, descubrimos que durante el transcurso de este proyecto la empresa había cambiado el antiespumante que utilizaba en sus cultivos por otro de marca y naturaleza diferentes. Se planteó entonces la hipótesis de que este cambio fue el causante de que no se hubiesen podido reproducir los resultados preliminares.

En base a esto, se planteó un nuevo experimento de unión de la toxina al MANAE, utilizando un cultivo sin antiespumante y otro con el nuevo antiespumante.

Los resultados de este ensayo, demostraron que efectivamente el nuevo antiespumante utilizado por la empresa era el causante de la interferencia en la unión de la toxina épsilon al soporte MANAE. Pues puede observarse que prácticamente toda la toxina, sin antiespumante, ofrecida al soporte se une a éste, y luego es eluida en su totalidad, por aumento en la fuerza iónica del medio, al final del ensayo (ver figura 18). Por el contrario, la toxina con antiespumante, no se unió al soporte, al igual que ocurrió en los ensayos anteriores (ver figura 18).



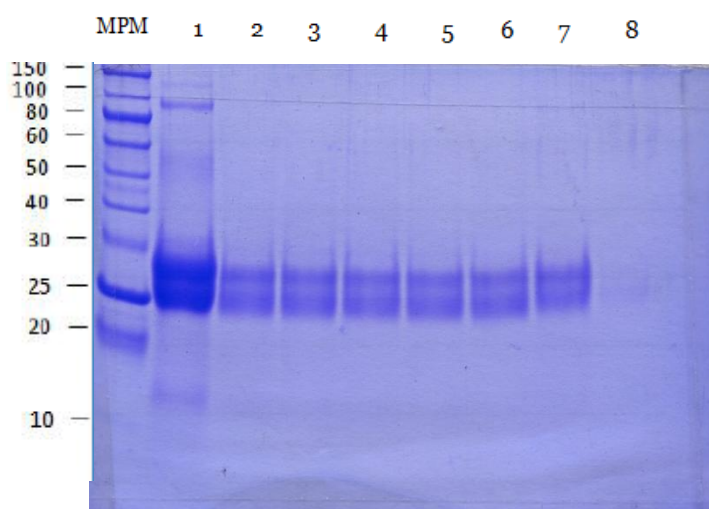
**Figura 18. Ensayo de adsorción y elución de la toxina con antiespumante y sin antiespumante.** 1) Toxina ofrecida con antiespumante; 2) Toxina ofrecida sin antiespumante; 3) Sobrenadante de la adsorción, con antiespumante; 4) Sobrenadante de la adsorción, sin antiespumante; 5) Derivado sin antiespumante; 6) Derivado con antiespumante; 7) Eluído sin antiespumante; 8) Eluído con antiespumante.

#### 5.4. Purificación de toxina épsilon por cromatografía afinidad

Otro soporte propuesto como posible purificador de la toxina épsilon, fue el soporte cromatográfico de afinidad, basado en micropartículas de agarosa funcionalizadas con anticuerpos comerciales anti toxina épsilon de *C. perfringens*.

##### 5.4.1. Inmovilización de anticuerpos a soporte heterofuncional

Del estudio por BCA de las muestras obtenidas se determinó que el tiempo óptimo para lograr una máxima unión de fragmentos Fab, cuando se trabaja con éstos en exceso, fue de 60 minutos (datos no mostrados). Por otra parte, se observó que la inmovilización por quelación libera ambas cadenas de los fragmentos al ser sometida a una electroforesis SDS-PAGE (ver figura 19). Sin embargo la unión covalente de los fragmentos Fab al soporte es muy estable frente al ambiente desnaturizante de una SDS-PAGE, aunque permite vislumbrar una banda muy tenue que puede deberse a que el fragmento Fab se encuentre unido por una sola de sus cadenas al soporte, permitiendo que la otra se desprenda del mismo.



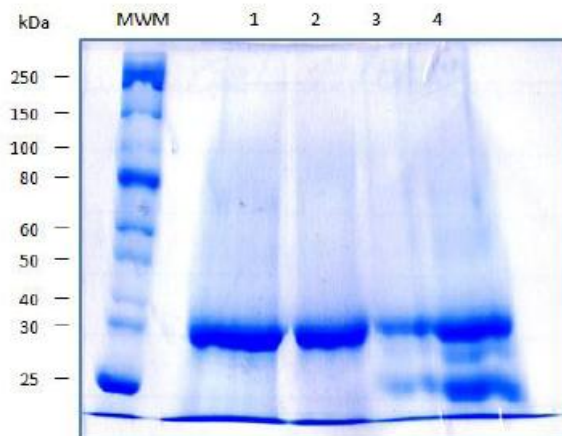
**Figura 19. Tiempo de incubación de la inmovilización de los anticuerpos.** **1)** Anticuerpo anti toxina épsilon ofrecido; **2)** Sobrenadante de la inmovilización en Glioxil/IDA/Cu, luego de 15 minutos; **3)** Luego de 30 minutos; **4)** Luego de 45 minutos; **5)** Luego de 60 minutos; **6)** Luego de 150 minutos; **7)** Anticuerpos inmovilizados en Glioxil/IDA/Cu por interacción con el quelato metálico; **8)** Anticuerpos inmovilizados covalentemente en Glioxil/IDA.

#### 5.4.2. Evaluación de la unión de toxina épsilon a soporte Glioxil/IDA - Ac

Las muestras analizadas demostraron que la unión de la toxina a los fragmentos de anticuerpos inmovilizados al soporte se da de manera lenta, puesto que no se observó un cambio significativo en la concentración de toxina a lo largo del tiempo dentro de períodos cortos de tiempo (2 horas).

Sin embargo, del estudio de las muestras de sobrenadante correspondientes a las 24 horas de incubación, pudo determinarse una disminución en la concentración de toxina con respecto a la concentración de toxina ofrecida inicialmente, que se correlaciona directamente con la concentración de toxina unida sobre el derivado luego de las 24 horas de incubación (ver figura 20).

Por otra parte, tanto en los carriles 3 y 4 se hace evidente la presencia de una segunda banda, de 25 KDa, que no se encontraba presente en las muestras de toxina ofrecida o de sobrenadante luego de la unión. Ésta, podría corresponder a uno de los brazos de los fragmentos Fab de anticuerpo inmovilizados al derivado, que se soltó por acción del buffer reductor utilizado al momento de preparar las muestras para correr la electroforesis SDS-PAGE.



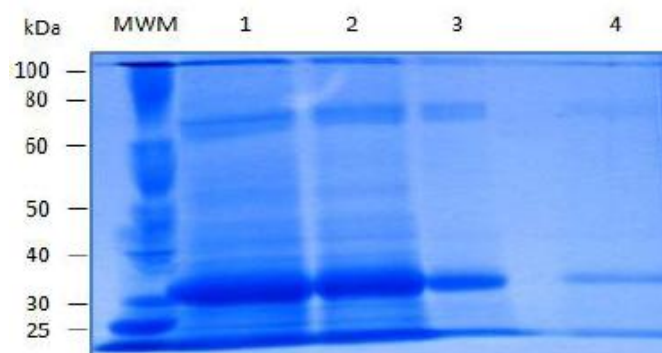
**Figura 20. Purificación de la toxina.** **1)** Toxina épsilon ofrecida; **2)** Sobrenadante de la adsorción de la toxina al anticuerpo anti toxina inmobilizado en Glioxil/IDA, luego de 24 horas; **3)** Derivado luego de una incubación de 2 horas con la toxina épsilon; **4)** Derivado luego de una incubación de 24 horas con la toxina épsilon.

### 5.4.3. Elución de la toxina épsilon

Como se ha reportado en el punto “4.5.2.”, se probaron dos estrategias diferentes para eluir eficazmente la toxina del soporte cromatográfico de afinidad.

Ambas estrategias de elución de la toxina funcionaron exitosamente; sin embargo aquella basada en la desorción de la toxina épsilon por ajuste del pH del medio hasta su punto isoeléctrico fue la que obtuvo mejores rendimientos (ver figura 21).

Además de la banda correspondiente a la toxina épsilon, puede observarse una segunda banda más pesada (de aproximadamente 80kDa), que estaba presente en el aplicado y que fue eluida junto con la toxina, luego de haber sido adsorbida por los fragmentos Fab del soporte (ver figura 21).



**Figura 21. Elución de la toxina.** **1)** Toxina épsilon ofrecida; **2)** Sobrenadante de la adsorción de la toxina a los anticuerpos anti toxina inmobilizados en Glioxil/IDA, luego de 24 horas; **3)** Toxina épsilon eluida por variación del pH hasta su punto isoeléctrico (pH 5.4); **4)** Toxina épsilon eluida por agregado de 1M NaCl.

Para identificar la banda correspondiente al peso molecular de la toxina épsilon y estudiar la naturaleza de la segunda banda, es decir, determinar si se une específicamente a los anticuerpos inmobilizados en la superficie del soporte o inespecíficamente al soporte; se realizó un Western Blot en el cual se corrieron las muestras de la toxina ofrecida y la toxina eluida por variación del pH hasta su punto isoeléctrico; y en el cual se identificaron las muestras con un anticuerpo primario específico contra la toxina de interés.

El revelado del Western Blot demostró que las bandas observadas anteriormente, que coincidían, según lo esperado, con el peso molecular de la toxina épsilon, correspondían efectivamente a la toxina en cuestión (ver figura 22).

Por otra parte, es importante señalar que la segunda banda más pesada, de la cual se desconoce su origen, también reaccionó con los anticuerpos primarios del inmunoensayo; por lo cual se ha planteado la hipótesis de que su existencia se deba a un agregado de moléculas de la toxina épsilon (ver figura 22).



**Figura 22. Identificación de la toxina épsilon por Western Blot. 1) Toxina épsilon ofrecida; 2) Toxina épsilon eluida por variación del pH hasta su punto isoeléctrico (pH 5.4).**

Finalmente, el análisis por BCA de las muestras de toxina ofrecida, adsorbida y eluida, corroboró los resultados obtenidos por las electroforesis anteriores. Es decir, que la toxina se une selectivamente al soporte cromatográfico de afinidad, con altos rendimientos de adsorción, y luego puede ser eluida eficazmente por los dos métodos propuestos, obteniéndose mejores rendimientos de elución al utilizar el método de variación de pH.

A su vez, permitió concluir que el soporte de afinidad sintetizado se une específicamente a su antígeno correspondiente con una adsorción equimolar del ligando (ver tabla 2), para luego ser eluido en una fracción con mayor grado de pureza.

Balance de masas	
Anticuerpo Inmovilizado	35 ± 1 μmol
Toxina Unida	45 ± 3 μmol

**Tabla 2. Balance de masas.** Relación equimolar entre el anticuerpo inmovilizado y la toxina unida.

## 5.5. Purificación de anticuerpos anti toxina épsilon

Tanto el soporte cromatográfico de intercambio iónico como el soporte cromatográfico de afinidad, permitieron cumplir con el objetivo de obtener toxina épsilon con un alto grado de pureza, de cara al desarrollo del tercer soporte cromatográfico, de afinidad, basado en micropartículas de agarosa funcionalizadas con moléculas de toxina épsilon, para la purificación específica de anticuerpos anti toxina épsilon.

### 5.5.1. Inmovilización de toxina épsilon a Glioxil

El análisis de las muestras por BCA de toxina ofrecida al Glioxil y sobrenadante de la inmovilización, revelaron que se logró inmovilizar un 36% de toxina.

A pesar que el rendimiento aparenta ser muy bajo, cabe la posibilidad de que se haya excedido la capacidad de carga del Glioxil con la concentración de toxina ofrecida.

Además, pudo evidenciarse por análisis de las muestras mediante electroforesis, que se pegó parte de la toxina ofrecida, lo cual apoya lo demostrado por el ensayo BCA. Aun así, la calidad de las bandas correspondientes a los carriles de la toxina ofrecida y el sobrenadante de la inmovilización no es muy buena, por lo cual cualquier conclusión que de allí se saque debe ser muy criteriosa (ver figura 23).

Cabe destacar que no fue posible repetir este experimento a tiempo para incluir nuevos resultados en la tesis. Sin embargo, a los efectos del proyecto Alianzas para la Innovación, se continuará indagando hasta descubrir la relación óptima de Glioxil y toxina, para inmovilizar el 100% del material ofrecido.

### 5.5.2. Purificación de anticuerpos anti toxina épsilon de *C.perfringens*

Los resultados arrojados por la electroforesis SDS-PAGE, de las muestras tomadas durante el ensayo de purificación de los anticuerpos, mostraron que se logró adsorber, eluir y por lo tanto purificar parte de la fracción ofrecida de anticuerpo proveniente del suero hiperinmune.

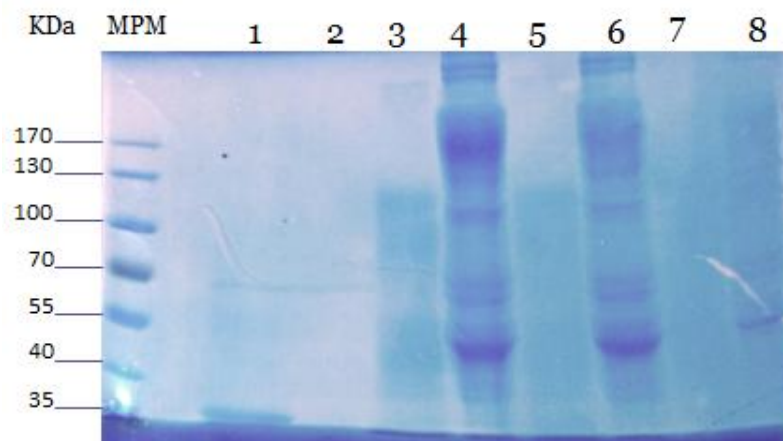
Por el contrario, observando el gel de poliacrilamida no pueden sacarse conclusiones con respecto al anticuerpo comercial, pues al observarlo, no pueden distinguirse claramente bandas en los carriles correspondientes a las muestras de anticuerpo ofrecido y sobrenadante de la unión al derivado, así como tampoco en la fracción eluida (ver figura 23).

Los carriles correspondientes a la fracción de antisuero ofrecido, el sobrenadante de la unión y el eluido, sí presentan bandas bien definidas que pueden ser discutidas. A pesar de que el rendimiento de unión fue bajo, el carril correspondiente al eluido se mostró significativamente más limpio que la fracción de partida, por lo cual se puede afirmar que la purificación se llevó a cabo de forma exitosa.

Por otra parte, el resultado del análisis de las muestras por BCA, demostró que hubo adsorción de ambos tipos de anticuerpos. De los 6.37 mg de anticuerpo comercial ofrecido, se adsorbió 1.46 mg al derivado, es decir un 23%; y de los 10.1 mg de proteínas totales ofrecidas en la muestra correspondiente al antisuero, se adsorbió 2.03 mg al derivado. Es importante recordar que el anticuerpo comercial ofrecido tiene un alto grado de pureza, por lo que se podría decir que la totalidad de proteína cuantificada por el método BCA corresponde efectivamente a éste. Sin embargo, la muestra del suero hiperinmune contiene una gran diversidad de proteínas además de los anticuerpos anti toxina épsilon de interés, por lo tanto se desconoce el rendimiento real de unión de los anticuerpos contenidos en el suero hiperinmune al soporte funcionalizado con la toxina .

Si se analiza la relación en términos de moles, entre la toxina inmovilizada y los anticuerpos adsorbidos, puede observarse que, con una concentración de 172  $\mu\text{mol}$  de toxina inmovilizada, se unieron 52  $\mu\text{mol}$  de anticuerpo comercial, y por otra lado, 45  $\mu\text{mol}$  de anticuerpos contenidos en el suero hiperinmune.

Nuevamente, cabe aclarar que el ensayo no pudo ser repetido por una cuestión de tiempo. Sin embargo, en el futuro se continuará ajustando y mejorando los parámetros del ensayo hasta obtener rendimientos de unión y purificación cercanos al 100%.



**Figura 23. Electroforesis con los ensayos de inmovilización de la toxina al Glioxil (carriles 1 y 2); y purificación de anticuerpos (carriles 3 a 8).** 1) Toxina ofrecida; 2) Sobrenadante de la inmovilización de la toxina al Glioxil; 3) Anticuerpo comercial ofrecido, dilución 1/20; 4) Antisuero ofrecido, dilución 1/20; 5) Sobrenadante de la unión del anticuerpo comercial; 6) Sobrenadante de la unión del antisuero; 7) Eluido del anticuerpo comercial; 8) Eluido del antisuero.

## **6. Análisis Económico**

A los efectos de la tesis para la obtención del título de grado de Licenciado en Biotecnología, se ha determinado que no corresponde la realización de un análisis económico.

## 7. Conclusión

Se logró cumplir con todos los objetivos planteados, ya que se sintetizaron y evaluaron dos matrices cromatográficas diferentes para la purificación de la toxina épsilon. Por otro lado, se alcanzó niveles de pureza del 90% cuando se trabajó con el derivado de agarosa funcionalizado con anticuerpos comerciales; y finalmente, los esfuerzos realizados por obtener un método prometedor en cuanto a la purificación de anticuerpos específicos contra toxina épsilon, a partir de un suero hiperinmune, arrojaron resultados muy favorables.

Sin embargo, merece la pena resaltar que aún queda mucho por hacer en cuanto a optimización de las tecnologías desarrolladas, pues hay muchas variables y relaciones que todavía deben ser puestas a punto.

De cualquier forma, resulta estimulante y satisfactorio el hecho de haber avanzado hasta este punto. Cada experimento ensayado y cada optimización realizada de estos, han significado un paso más hacia la meta, cada vez más cercana, de mejorar los procesos de producción de vacunas para salud animal que comercializa Laboratorios Santa Elena, y de innovar generando nuevas alternativas a la experimentación animal, que se impongan por su versatilidad, bajos costos y eficiencia.

## 8. Referencias bibliográficas

1. Balasubramaniam D, Wilkinson C, Van Cott K, Zhang C. Tobacco protein separation by aqueous two-phase extraction. *J Chromatogr A* 2003 Mar; 989(1): 119-129.
2. Hitsumoto Y, Morita N, Yamazoe R, Tagomori M, Yamasaki T, Katayama S. Adhesive properties of clostridium perfringens to extracellular matrix proteins collagens and fibronectin. *Anaerobe* 2014 Nov; 25(1):67-71.
3. Zhao Y, Kang L, Gao S, Zhou Y, Su L, Xin W, Su Y, Wang J. Expression and purification of functional clostridium perfringens alpha and epsilon toxins in escherichia coli. *Protein Expr Purif* 2011 Feb; 77(2): 207-213.
4. College of Veterinary Medicine, Iowa State University. Toxina epsilon de Clostridium perfringens. Ames, Iowa; 2004 Jan.
5. Cavalcanti MT, Porto T, Figueiredo AL, Brandi IV, de Lima JL, Pessoa A. Large scale purification of Clostridium perfringens toxins: a review. *Braz J Pharm Sci.* 2004 Jun; 40(2): 151-164.
6. Ferrarezi MC, Curci VC, Cardoso TC. Cellular vacuolation and mitochondrial-associated factors induced by clostridium perfringens epsilon toxin detected using acoustic flow cytometry. *Anaerobe* 2013 Dec; 24(1): 55-59.
7. Cole A, Gibert M, Popoff M, Moss D, Titball R, Basak A. Clostridium perfringens  $\epsilon$ -toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. *Nat Struct Mol Biol* 2004 Aug; 11(8): 797-799.
8. Flores-Diaz M, Thelestam M, Clark GC, Titball RW, Alape-Giron A. Effects of clostridium perfringens phospholipase c in mammalian cells. *Anaerobe* 2004 Apr; 10(2): 115-123.
9. Titball R, Williamson E, Havard H, Oyston P, Payne D; The Secretary of State for Defense DSTL Porton Down, asignado. Vacuna contra Clostridium perfringens. España, 0888453; 2004 Nov 01.
10. Osman K, El-Enbaawy M, Hassan H, Ezzeldin N, Hussein H. A rapid screening identification of Clostridium perfringens alpha and epsilon toxins recovered from mastitic bovine milk by SDS-PAGE electrophoresis. *Adv in Nat Appl Sci* 2009 May; 3(2): 253-259.
11. Chase HA. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. *Trends Biotechnol* 1994 Aug; 12(8): 296-303.

12. Thömmes, J. Fluidized bed adsorption as a primary recovery step in protein purification. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Berlin: Springer 1997 Jun; 58(1): 185-230.
13. Shukla AA, Thommes J. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends Biotechnol* 2010 May; 28(5): 253-261.
14. Narayanan, SR. Preparative affinity chromatography of proteins. *J. Chromatogr. A* 1994 Jan; 658(2): 237-258.
15. Tsonev LI, Hirsh AG. Theory and applications of a novel ion exchange chromatographic technology using controlled pH gradients for separating proteins on anionic and cationic stationary phases. *J. Chromatogr. A* 2008 Jul; 1200(2): 166-182
16. Pessela BC, Fuentes CM, et al. Purification and very strong reversible immobilization of large proteins on anionic exchangers by controlling the support and the immobilization conditions. *Enzyme Microb Tech* 2006 Aug; 39(4): 909-915.
17. Ceinos MADC, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM, Molina-Rosell C, Inventores; Ceinos MADC, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM, Molina-Rosell C, asignado. Procedimiento de fabricación de soportes sólidos inertes activados con grupos amino. España, WO1994001454; 1993 Jul 02.
18. Henry A. Rowland Department of Physics & Astronomy, *Methods in Cell Biology* [Internet]. Baltimore (Maryland): Johns Hopkins University; 2005 Jan. Disponible desde: [http://www.pha.jhu.edu/~ghzheng/old/webct/note1\\_1.htm](http://www.pha.jhu.edu/~ghzheng/old/webct/note1_1.htm)