

**INSTITUTO TECNOLOGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGIA**

**INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACION**

**APLICACION DE OSMOLITOS COMO ESTABILIZANTES TERMICOS DE  
SOLUCIONES DE INMUNOGLOBULINAS EQUINAS**

**Esteban González Chavarría**

**CARTAGO, 2006**

**INSTITUTO TECNOLOGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGIA**

**INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACION**

**APLICACION DE OSMOLITOS COMO ESTABILIZANTES TERMICOS DE  
SOLUCIONES DE INMUNOGLOBULINAS EQUINAS**

**Esteban González Chavarría**

**CARTAGO, 2006**

# APLICACION DE OSMOLITOS COMO ESTABILIZANTES TERMICOS DE SOLUCIONES DE INMUNOGLOBULINAS EQUINAS

Esteban González Chavarría\*

## RESUMEN

El proceso de purificación de proteínas comúnmente implica un detrimento en la estructura y actividad biológica de las mismas, provocado por un número variable de factores, en especial la temperatura. Los anticuerpos presentes en los sueros antiofidicos no están exentos, y en vista de que son responsables de la acción neutralizante del veneno, resulta vital favorecer su estabilidad.

En la actualidad se plantean diversas estrategias de estabilización proteica, siendo la más común, sencilla y eficaz, la aplicación de aditivos que modifican favorablemente el entorno de las proteínas. Las diversas observaciones respecto al uso de ciertos osmolitos como estabilizantes, han llevado a la conclusión de que estos compuestos previenen la pérdida de la actividad enzimática, inhiben la agregación irreversible y aumentan la temperatura de transición térmica de diversas macromoléculas.

Por tanto, se probaron tres de estos osmolitos: sorbitol, manitol y glicina, en la estabilización térmica de soluciones de inmunoglobulinas producidas por el Instituto Clodomiro Picado, durante el proceso de la pasteurización.

A partir de pruebas de análisis como ELISA, cromatografía líquida para proteínas y espectroscopía de infrarrojo, se determinó que el sorbitol favorece la protección de las inmunoglobulinas durante la desnaturalización provocada por las altas temperaturas, a la vez que se plantean como prometedores estabilizantes en el almacenamiento a mediano plazo. No obstante, no se pudo evitar la aparición de turbidez, lo cual a nivel comercial es indeseable y constituye un factor a corregir.

Palabras clave: antivenenos, inmunoglobulinas, termoestabilización, sorbitol, manitol, glicina.

---

\* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

# APPLICATION OF OSMOLYTES AS THERMAL STABILIZERS OF EQUINE IMMUNOGLOBULIN SOLUTIONS

Esteban González Chavarría\*

## SUMMARY

The purification process of proteins is commonly associated with loss of biological activity of these compounds, due to numerous and variable effects, specially temperature. The antibodies contained in snake antivenoms are not an exemption, and because they are responsible for neutralizing the effects of venom, it turns out vital to favor their stability.

Currently, there are various protein stabilization strategies, in which case the application of additives that modify the surroundings of the protein is the simplest and more effective alternative. According to the investigations about the implementation of certain osmolytes as stabilizers, these molecules had shown to prevent the loss in enzymatic activity, inhibit the irreversible aggregation and also increase the thermal transition temperature of diverse macromolecules.

Therefore, the thermal stabilization effect of three of this osmolytes: sorbitol, manitol and glycine, was studied during the pasteurization of equine immunoglobulin solutions produced by the Instituto Clodomiro Picado.

Based on analysis tests including ELISA, fast protein liquid chromatography and infrared spectroscopy, it was determined that sorbitol favors the protection of immunoglobulins during the denaturalizing process derived of the application of high temperatures. Additionally, it seems like a promising stabilizer during mid- and long term storage. Although these positive results, it could not be prevented the apparition of turbidity, and because it is an undesirable feature for a pharmaceutical product, it is an important aspect to correct.

Key words: antivenoms, immunoglobulin, thermostabilization, sorbitol, manitol, glycine.

---

\* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

**APLICACION DE OSMOLITOS COMO ESTABILIZANTES TERMICOS DE  
SOLUCIONES DE INMUNOGLOBULINAS EQUINAS**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial  
para optar por el título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

**Miembros del Tribunal**

---

**Dr. Miguel Rojas Chávez  
Profesor Asesor - ITCR**

---

**B.Q. María Herrera Vega  
Asesora - ICP**

---

**Dr. Guillermo León Montero  
Lector**

## **DEDICATORIA**

**A mis padres, por su cariño, apoyo, comprensión y sobretodo, por haber formado el individuo que escribió esto.**

**A la increíble persona que cambió mi forma de ver el mundo.**

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento a los siguientes organismos y personas, por su colaboración para hacer realidad el presente trabajo:

Al Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica, en la persona de su directora, la Dra. Yamileth Angulo. A los funcionarios de la División de Producción de dicho Instituto. En particular, a la B.Q. María Herrera Vega, tutora, por sus constantes sugerencias, comentarios y cuyo aporte fue vital para la realización del presente trabajo; al Dr. Guillermo León Montero, por permitir la realización de esta investigación, sus valiosos aportes y recomendaciones; y al Lic. Álvaro Segura, por su apoyo incondicional durante la ejecución del proyecto. Así mismo al Dr. Gustavo Rojas por haber facilitado nuestra vinculación con el Instituto.

Al Dr. Miguel Rojas Chávez, profesor consejero, por sus valiosas sugerencias y aportes en el desarrollo del presente trabajo.

Al sistema de educación superior público del país, en especial al Instituto Tecnológico de Costa Rica, por la formación académica y su contribución a nuestro desarrollo profesional.

# **INDICE GENERAL**

---



	<b>Pág.</b>
RESUMEN.....	i
ACREDITACION.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE GENERAL.....	vi
INDICE DE CUADROS.....	viii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INTRODUCCION.....	11
REVISION DE LITERATURA.....	12
El accidente ofídico en Costa Rica.....	12
Proteínas y estabilidad.....	16
Estrategias de estabilización proteica.....	19
OBJETIVOS.....	26
METODOLOGIA.....	27
Ensayo de pasteurización .....	27
Medición de turbidez.....	28
Determinación de proteína total.....	28
Determinación del título de anticuerpos.....	29
Análisis de agregados .....	30
Estudio de la estructura secundaria .....	33
RESULTADOS .....	34
Ensayo de pasteurización .....	34
Medición de turbidez.....	37
Determinación de proteína total.....	37
Determinación del título de anticuerpos.....	39
Análisis de agregados .....	42
Estudio de la estructura secundaria .....	49

	<b>Pág.</b>
<b>DISCUSION DE RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
<b>Ensayo de pasteurización .....</b>	<b>52</b>
<b>Elección y aplicación de los osmolitos.....</b>	<b>53</b>
<b>Turbidez.....</b>	<b>55</b>
<b>Cantidad de proteína total en solución.....</b>	<b>58</b>
<b>Título de anticuerpos.....</b>	<b>58</b>
<b>Formación de agregados .....</b>	<b>59</b>
<b>Estructura secundaria proteica.....</b>	<b>62</b>
<b>Estabilidad a largo plazo .....</b>	<b>64</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>68</b>

## **INDICE DE CUADROS**

---



<b>Núm.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Cantidad de osmolito empleada para los diferentes ensayos de pasteurización.	27
2	Componentes necesarios para la preparación de la parte inferior de un gel para SDS-PAGE.	30
3	Componentes necesarios para la preparación de la parte superior de un gel para SDS-PAGE.	31
4	Marcador de alto peso molecular empleado para el SDS-PAGE.	32
5	Marcador de bajo peso molecular empleado para el SDS-PAGE.	32
6	Unidades nefelométricas de turbidez (NTU) de las muestras del ensayo de pasteurización con sorbitol.	37
7	Cantidad de proteína (g/dl) presente en las muestras durante el primer ensayo de pasteurización con suero líquido.	38
8	Cantidad de proteína (g/dl) presente en las muestras durante el ensayo de pasteurización con plasma.	38
9	Porcentaje de agregación presente en diferentes muestras de suero líquido polivalente.	49
10	Solubilidad en agua de los osmolitos utilizados.	56

## **INDICE DE FIGURAS**



<b>Núm.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Representación esquemática de una molécula de inmunoglobulina.	17
2	Principales procesos de inestabilidad observados en proteínas de uso farmacéutico.	18
3	Ilustración esquemática de la interacción preferencial de una proteína con un osmolito estabilizante de proteínas.	23
4	Apariencia de las muestras después de 10 horas de calentamiento a 60 °C para el primer ensayo con suero líquido polivalente.	34
5	Apariencia de las muestras después de 10 horas de calentamiento a 60 °C para el ensayo con plasma equino polivalente.	35
6	Estructuras cristalinas en las muestras de suero líquido polivalente con glicina.	36
7	Apariencia de las muestras después de 10 horas de calentamiento a 60 °C para el segundo ensayo con suero líquido polivalente.	37
8	Niveles de proteína total para las muestras con mayor concentración de osmolito en suero líquido polivalente pasteurizado.	39
9	Resultados de una prueba de ELISA para las diferentes concentraciones de osmolito en suero líquido al finalizar la pasteurización.	40
10	Mantenimiento del título de anticuerpos por parte de cada osmolito después de la pasteurización de muestras de suero líquido polivalente.	40
11	Resultados de una prueba de ELISA para las diferentes concentraciones de sorbitol del segundo ensayo de pasteurización en suero líquido.	41
12	Mantenimiento del título de anticuerpos por parte de cada osmolito después de la pasteurización de muestras de plasma equino polivalente.	42
13	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% para muestras no reducidas de suero con sorbitol y manitol.	43

<b>Núm.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
14	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% para muestras reducidas de suero líquido con sorbitol del segundo ensayo de pasteurización.	44
15	Patrón cromatográfico de FPLC de una muestra control de suero líquido sin pasteurizar.	45
16	Patrón cromatográfico de FPLC de una muestra de suero líquido polivalente pasteurizada con sorbitol 1.0 M.	46
17	Patrón cromatográfico de FPLC de una muestra de suero líquido polivalente pasteurizada con sorbitol 1.5 M.	47
18	Patrón cromatográfico de FPLC de una muestra de suero líquido polivalente pasteurizada con sorbitol 2.0 M.	48
19	Espectro infrarrojo de la segunda derivada en la región amida I de muestras de suero líquido polivalente.	50
20	Espectro infrarrojo de la segunda derivada en la región amida I de una muestra control de suero líquido polivalente pasteurizada.	51

## **INTRODUCCIÓN**

---



En muchas partes del mundo, el ofidismo es un problema sanitario al que se le presta especial atención, a causa de las características clínicas críticas que se presentan con las mordeduras de serpientes venenosas. En este sentido, la eficacia de los sueros antiofídicos enfrenta problemas que se traducen en una pérdida de su capacidad neutralizante al momento de su aplicación, debido a un mal manejo en su almacenamiento y a un incorrecto seguimiento de las recomendaciones del fabricante (Theakston *et al.*, 2003). Algunos factores explicativos tienen que ver con las altas temperaturas y a la carencia de sistemas de refrigeración adecuados (Rojas *et al.*, 1990). Al respecto, se encuentra bastante documentado que las temperaturas elevadas favorecen la desnaturalización o precipitación irreversible de las inmunoglobulinas, tal como ocurre con las proteínas en general, las cuales al perder su conformación tridimensional, pierden su funcionalidad (Mathews *et al.*, 2002).

En general, desde el punto de vista farmacéutico, existe una fundamentación teórica y metodológica ya establecida en lo que respecta a los parámetros de estabilidad de las proteínas, a corto y largo plazo, que se aplican en el campo de la producción de sueros. Sin embargo, el problema del ofidismo en el mundo se concentra principalmente en regiones pobres, lo que hace que las grandes compañías farmacéuticas no se interesen por incentivar la investigación en un área no considerada como rentable por su escaso valor comercial. De allí la trascendencia de realizar investigaciones que busquen aportar una solución al problema apuntado.

En lo fundamental, se pretende que los resultados que se obtengan con este trabajo constituyan una experiencia valiosa en dos sentidos. En primera instancia, para posibilitar la incorporación de un paso adicional que refuerce la seguridad viral del producto final, el cual consiste en el empleo de la pasteurización, proceso que no es posible aplicar en la actualidad, bajo las condiciones actuales del suero, por su susceptibilidad a las altas temperaturas que se requieren. En segundo lugar, los resultados constituirían un aporte importante en lo que respecta a la prevención de la desestabilización y pérdida de eficacia del suero, debido a inadecuadas condiciones de almacenamiento. En última instancia, se procura alcanzar la estabilización térmica de las inmunoglobulinas manteniendo la potencia neutralizante del suero, generando la menor cantidad posible de reacciones adversas en las personas a las que se apliquen.

## REVISION DE LITERATURA

---



### EL ACCIDENTE OFIDICO EN COSTA RICA

En nuestro país, se calcula que ocurren alrededor de 600 casos anuales de envenenamientos a causa de la mordedura por serpientes venenosas. De este número de afectados, se ha determinado que de 8 a 12 personas mueren producto del efecto de los venenos y un gran porcentaje se convierten en incapacitados laborales (Chaves *et al.*, 1996), lo cual acarrea un grave problema desde el punto de vista económico y familiar.

Debido a la relevancia de este fenómeno y a la ausencia de métodos efectivos para su tratamiento, en abril de 1970 se funda el Instituto Clodomiro Picado (ICP) en Dulce Nombre de Coronado (Chaves *et al.*, 1996). A partir de ese momento, la misión del Instituto se ha orientado a la búsqueda de soluciones concretas al problema del ofidismo en Costa Rica y al desarrollo de importantes labores de investigación y transferencia de conocimiento hacia las comunidades.

Al respecto, resulta necesario destacar que el ICP es el único centro productor de sueros antiofídicos del área centroamericana, los cuales son el tratamiento específico para las mordeduras producidas por serpientes venenosas. Los sueros antiofídicos elaborados, se usan tanto en el territorio nacional como en otros países centroamericanos y en algunos países de América del Sur. En la actualidad, se producen alrededor de 100.000 frascos de antiveneno al año, siendo los sueros polivalentes los que se producen con mayor frecuencia (Chaves *et al.*, 1996).

### Serpientes venenosas de Costa Rica

Las serpientes son reptiles (Clase *Reptilia*, Suborden *Ophidia*), las cuales se caracterizan por presentar un cuerpo alargado y cilíndrico; son ápodas, es decir no tienen extremidades, y tienen un esqueleto óseo muy flexible (Solórzano, 2004). La herpetofauna mundial es sumamente abundante, existiendo alrededor de 2400 especies de ofidios (Chaves *et al.*, 1996).

De acuerdo con Solórzano (2004), en Costa Rica podemos encontrar alrededor de 136 especies de serpientes, con una distribución geográfica muy amplia en todo el territorio, aunque la mayor parte se ubican en las regiones del trópico húmedo. La mayoría son serpientes no venenosas (118 especies) que

pertenecen a las familias *Colubridae*, *Boidae*, *Anomalepididae*, *Leptotyphlopidae* y *Typhlopidae*, por lo que no representan un peligro potencial para el ser humano aunque la mordedura de algunas de ellas puede ser muy dolorosa.

Por tanto, de las serpientes existentes en nuestro país, solamente 18 especies son venenosas y representan a los ofidios de mayor importancia desde el punto de vista médico. Estas se ubican en las familias *Viperidae* (comúnmente conocidas como "tobobas"), *Hydrophiidae* ("serpiente de mar") y *Elapidae* ("corales"). De este grupo, las serpientes de la familia *Viperidae* son las más relevantes, en primer lugar porque se ha demostrado que ocasionan la mayoría de los envenenamientos ofídicos y en segundo término, porque los efectos ocasionados por el veneno son los más diversos y graves, generalmente dejando secuelas significativas en la persona mordida (Solórzano, 2004).

#### **Envenenamiento producido por serpientes**

El veneno es una secreción tóxica que poseen algunos grupos de serpientes para inmovilizar y matar a su presa, se produce y almacena en glándulas ubicadas en la parte superior de la cabeza (Chaves *et al.*, 1996). Es una mezcla muy compleja, constituida por una variedad de enzimas como fosfolipasas, enzimas procoagulantes y proteolíticas; toxinas sin actividad enzimática; sales y aminoácidos, entre otros (Rojas *et al.*, 2001).

Los efectos del envenenamiento por serpientes son muy variables, pueden incluir efectos locales, como hemorragia, edema y mionecrosis; o efectos sistémicos, incluyendo coagulopatías, insuficiencia renal, hipotensión y choque cardiovascular (Al-Abdulla *et al.*, 2003; Gutiérrez *et al.*, 1988; Rojas *et al.*, 2001). El grado de severidad de los envenenamientos depende de varios factores, entre ellos: la cantidad de veneno inyectado, el sitio anatómico de la mordedura (en la cabeza y el tronco suelen ser los casos más severos), peso y talla (en niños las mordeduras se complican con frecuencia), y el estado fisiológico del individuo (Rojas *et al.*, 2001).

#### **Producción y purificación de sueros antiofídicos**

De acuerdo con lo expuesto en las publicaciones de Al-Abdulla *et al.* (2003), Gutiérrez *et al.* (1988), Lalloo y Theakston (2003) y Theakston *et al.* (2003), la producción industrial de antivenenos se puede resumir en cuatro etapas principales:

#### I- Obtención de veneno

Los venenos constituyen la materia prima indispensable para la producción de los antivenenos (Lalloo y Theakston, 2003). Para extraer el veneno, usualmente se pone a morder a la serpiente sobre una tela de nylon, se exprimen manualmente las glándulas y se recoge en un recipiente de vidrio. El veneno se extrae individualmente a cada espécimen, y se mantiene congelado o liofilizado para que no se altere su composición química.

#### II- Inmunización (producción del antisuero)

Esta etapa se inicia mediante la inmunización de animales con el veneno. Se utilizan principalmente los caballos por la facilidad en el manejo, alta tolerancia al veneno y los grandes volúmenes de sangre que permiten obtener durante el período de producción (Lalloo y Theakston, 2003). En algunas ocasiones se han empleado carneros, sobre todo para aquellas personas que presentan hipersensibilidad a las proteínas de equinos; también se reportan algunos casos en los que se ha utilizado camellos (Theakston *et al.*, 2003).

La inmunización consiste en la inyección subcutánea de una solución salina de veneno y adyuvante (potenciador de la respuesta inmune) sucesivamente durante varios meses. Si al finalizar el esquema de inmunización los animales no tienen un alto título de anticuerpos neutralizantes, se procede a dar varias dosis de refuerzo, y si no hay una respuesta positiva se eliminan del programa de inmunización.

Un vez que se ha completado el proceso de inmunización, y luego de las evaluaciones pertinentes que evidencien un título adecuado de anticuerpos en el suero de los animales, se realiza una sangría de producción. Esta consiste, en obtener varios litros de sangre por punción de la vena yugular, la cual es inmediatamente colectada asépticamente en recipientes estériles que contienen un anticoagulante (Chaves *et al.*, 1996).

#### III- Fraccionamiento (purificación) del plasma

En este punto se inicia el proceso de purificación de las inmunoglobulinas (anticuerpos neutralizantes) que fueron producidas por los animales durante la inmunización. Una vez en el laboratorio, los envases conteniendo la sangre se dejan reposar a 4 °C, de forma que se separa el plasma (sobrenadante donde se encuentran los anticuerpos) de los glóbulos rojos, los cuales en el caso del ICP son retornados a cada uno de los animales en una solución con glucosa, con el fin de evitarles estados de anemia (Chaves *et al.*, 1996).

La purificación del plasma obtenido implica la eliminación de otras sustancias, como por ejemplo el fibrinógeno (proteína que interviene en la coagulación sanguínea) y la albúmina. Dentro de los métodos de fraccionamiento se citan la precipitación salina (sulfato de amonio), la cromatografía de intercambio iónico o de afinidad, y la precipitación con ácidos grasos como el ácido caprílico (Theakston *et al.*, 2003).

El método de purificación con sales es el más empleado (Chaves *et al.*, 1996). Consiste en la mezcla de plasma con una solución de sulfato de amonio al 12% con el propósito de precipitar y eliminar el fibrinógeno. Luego, al filtrado obtenido se le efectúa una segunda precipitación con la misma sal pero a una concentración final de 24%, con el fin de que las inmunoglobulinas precipiten (en el filtrado se recoge la albúmina). De esta manera, el precipitado se reconstituye con agua y se dializa por varios días para eliminar el sulfato de amonio. En el caso del ICP, este último paso se realiza con ácido caprílico de acuerdo al procedimiento expuesto por Rojas *et al.* (1994).

Posteriormente, los anticuerpos se diluyen de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Por ejemplo, en el caso del suero polivalente producido en el ICP, la dilución se realiza hasta que cada ml de suero sea capaz de neutralizar de 3 a 4 mg de veneno (Chaves *et al.*, 1996). Por último, el antiveneno es esterilizado por filtración en membranas con un poro de 0,22 micrómetros, y envasado estérilmente.

#### IV- Control de calidad

El control se realiza tanto durante el proceso de purificación como en el producto final envasado, como lo establecen las normas sanitarias internacionales para productos biológicos de uso humano. Por lo tanto, para cumplir con esas normas el producto se somete a pruebas biológicas para determinar potencia (neutralización), esterilidad (ausencia de bacterias y hongos), presencia de pirógenos, inocuidad y seguridad; pruebas químicas, para medir la concentración de proteínas y de albúmina, el contenido de sales o fenol y el pH. Además, se realizan pruebas físicas, que analizan la presencia de partículas y turbidez, así como el color del producto (Theakston *et al.*, 2003).

En última instancia, la presentación del producto final varía de acuerdo con el método y las especificaciones del fabricante. La adición de preservantes químicos a los antivenenos es ampliamente utilizada, siendo los más comunes el fenol, el timerosal y el cresol. Así mismo, el producto puede presentarse en forma líquida o liofilizada. La forma líquida debe ser

almacenada a 4 °C., tiene la capacidad de estar lista para usarse de inmediato y posee un período de caducidad de alrededor de 3 años. Por su parte, el liofilizado no necesariamente debe mantenerse en refrigeración, se disuelve antes de usar en agua estéril y tiene una vida media de 5 años (Theakston *et al.*, 2003).

## PROTEÍNAS Y ESTABILIDAD

Las proteínas llevan a cabo funciones de importancia crítica para las células, pudiendo actuar como catalizadores de una amplia variedad de reacciones, como parte integral de diferentes estructuras celulares, o en tareas mucho más específicas como las inmunoglobulinas (Madigan *et al.*, 1999). Tal como se mencionó anteriormente, éstas últimas son las proteínas más valiosas en la producción de sueros antiofídicos, responsables de neutralizar los efectos de las toxinas presentes en el veneno de las serpientes. A continuación se expondrán sus principales características.

### Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas o anticuerpos son moléculas específicas del sistema inmune, capaces de combinarse con una gran variedad de determinantes antigénicos. Se hallan presentes en el suero y en otros líquidos corporales como las secreciones gástricas y la leche (Madigan *et al.*, 1999).

Las inmunoglobulinas (Ig) pueden dividirse en cinco clases principales: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, basándose en sus propiedades físicas, químicas e inmunológicas, aunque en la mayor parte de los individuos, cerca del 80% de las inmunoglobulinas del suero pertenecen a la clase IgG (Mathews *et al.*, 2002), lo cual también es válido para el suero antiofídico (Gutiérrez *et al.*, 1988; Rodríguez *et al.*, 1997; Theakston *et al.*, 2003).

Las moléculas de IgG están compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos “pesadas” con 446 residuos de aminoácidos (aproximadamente 50kDa), y dos “livianas” con 214 residuos de aminoácidos (aproximadamente 25kDa). Estas cadenas están unidas por medio de puentes di-sulfuro entrecruzados, dando la forma característica de “Y” a la estructura (Figura 1), y definiendo tres fragmentos principales: dos F<sub>ab</sub> o fragmento de unión al antígeno y un F<sub>c</sub> o fragmento cristalizante (Mathews *et al.*, 2002; Relkin *et al.*, 2000).

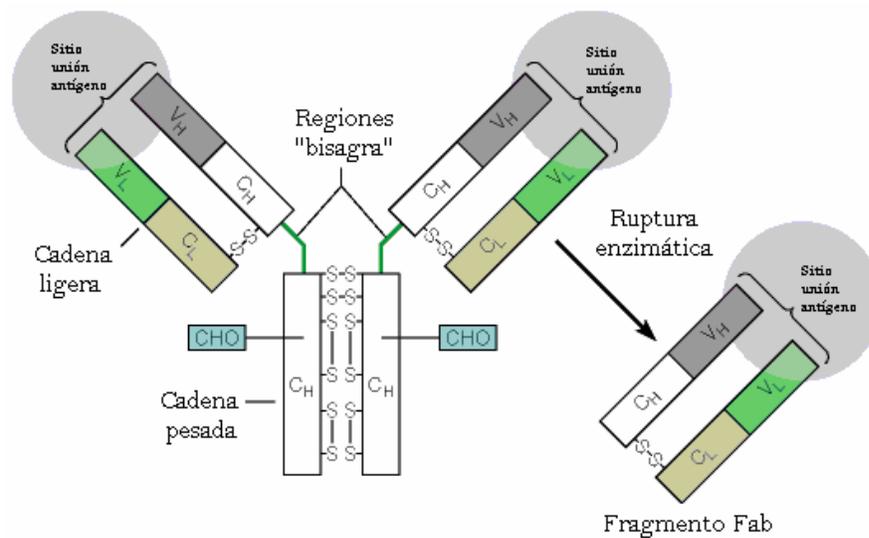


Fig.1. Representación esquemática de una molécula de inmunoglobulina (Tomado y modificado de Mathews *et al.*, 2002).

### Desnaturalización en proteínas para uso farmacéutico

En la actualidad, las proteínas producidas por medio de la biotecnología comprenden una porción muy significativa de la industria farmacéutica, incluyendo reguladores de funciones, activadores o inhibidores enzimáticos, anticuerpos poli o monoclonales, y vacunas (Manning *et al.*, 1989; Wang, 1999); esto por cualidades muy especiales como su alta eficacia a bajas concentraciones (Carninci *et al.*, 1998). Sin embargo, las proteínas poseen propiedades químicas y físicas tan particulares, que hacen que se presenten muchas dificultades en los procesos de purificación, separación, almacenamiento y manipulación, en contraste con la mayoría de moléculas orgánicas de uso farmacéutico (Wang, 1999).

Cuando las proteínas se exponen a alguna sustancia o proceso que afecta sus propiedades de plegamiento, se dice que sufren desnaturalización (Madigan *et al.*, 1999). Por lo general, los enlaces peptídicos no resultan afectados cuando las proteínas se desnaturalizan y por tanto, la estructura primaria (secuencia de aminoácidos) permanece inalterada (Mathews *et al.*, 2002). Sin embargo, la desnaturalización ocasiona un desplegamiento en la cadena polipeptídica, al destruirse la estructura de orden superior de la molécula, en particular por la ruptura de los enlaces de hidrógeno (Carninci *et al.*, 1998). Dependiendo de las condiciones de dicha desnaturalización, el polipéptido puede volver a plegarse, una vez suprimido el agente desnaturalizante, pero

este fenómeno por lo general conlleva la pérdida de la actividad biológica de la proteína (Mathews *et al.*, 2002).

En resumen, podemos separar las vías de degradación proteica en términos de inestabilidad química o física (Figura 2). La inestabilidad química puede definirse como cualquier proceso que involucre modificación de la proteína por medio de formación o ruptura de enlaces, originando una nueva entidad química. La hidrólisis de uniones peptídicas, la incorrecta formación de uniones disulfuro, y la oxidación o beta-eliminación de aminoácidos, son algunos ejemplos de inestabilidad química (Manning *et al.*, 1989). Por su parte, la inestabilidad física se refiere a cambios en la estructura de orden superior de la proteína. Dentro de este grupo se incluyen la agregación, la precipitación y la desnaturalización (Manning *et al.*, 1989).

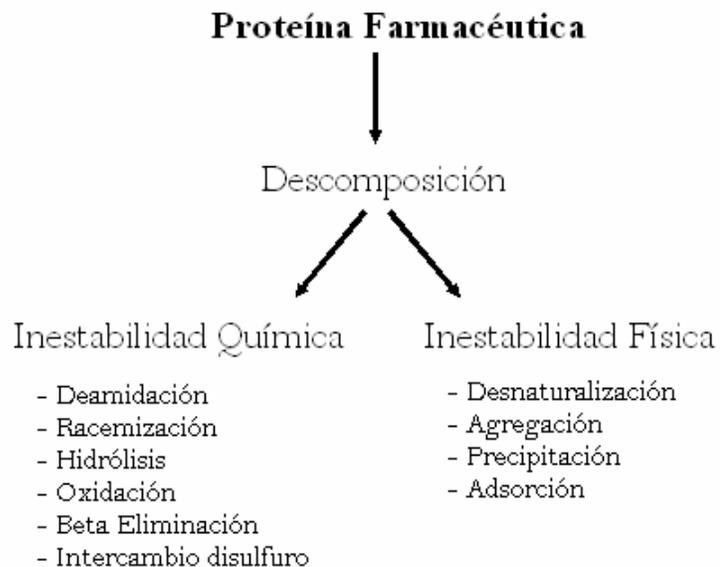


Fig. 2. Principales procesos de inestabilidad observados en proteínas de uso farmacéutico (Tomado y modificado de Manning *et al.*, 1989).

### Estabilidad a largo plazo de las inmunoglobulinas

Los productos purificados de inmunoglobulinas usualmente son bastante estables, y las preparaciones liofilizadas por lo general presentan una vida útil mayor que las formas líquidas, lo cual es una ventaja cuando las condiciones de distribución y almacenaje no pueden ser controladas

(Carpenter *et al.* 1998). La experiencia con preparaciones de inmunoglobulinas ha demostrado que pueden ocurrir problemas de inestabilidad debido a la desnaturalización de las IgG tanto durante el proceso de producción como en el almacenamiento, lo cual resulta en la formación de agregados (Theakston *et al.*, 2003). Aunque solo una pequeña fracción del total del contenido de proteína esté irreversiblemente desnaturalizada y agregada, el producto no será aceptable bajo ninguna circunstancia (Carpenter *et al.* 1998; González *et al.*, 1995; Lalloo y Theakston, 2003; Theakston *et al.*, 2003).

Esta inestabilidad no es fácil de predecir y cambios sutiles en el procesamiento, la calidad de la materia prima o las condiciones de almacenaje, han demostrado poseer efectos adversos en el desempeño del producto final (Carpenter *et al.* 1998; Theakston *et al.*, 2003). Debido a estos problemas, se torna imperativo buscar alternativas para prevenir o controlar en cierta medida, todas aquellas posibles condiciones que desnaturalicen las inmunoglobulinas. Las principales estrategias puestas en práctica hoy día se comentan en la siguiente sección.

#### **ESTRATEGIAS DE ESTABILIZACION PROTEICA**

En la búsqueda de formas de estabilizar proteínas, los científicos han tornado su atención hacia la naturaleza, por lo que las principales estrategias se derivan de mecanismos naturales que emplean ciertos organismos para sobrevivir a condiciones extremas (Arakawa *et al.*, 2001; Jaenicke, 2000). Por ejemplo, ciertas bacterias hipertermófilas crecen a temperaturas cercanas o mayores a los 100 °C (Madigan *et al.*, 1999), lo cual implica que las proteínas de estos organismos funcionan normalmente a esas temperaturas. Al respecto, se han determinado ciertas características especiales que permiten la estabilidad de dichas proteínas, las cuales incluyen interacciones hidrofóbicas más fuertes, mayor empaquetamiento molecular, mayor cantidad de uniones de hidrógeno y presencia de aminoácidos formadores de hélices (Jaenicke, 2000; Manning *et al.*, 1989; Wang, 1999). También han sido reportados otro tipo de factores estabilizantes, no relacionados de manera directa con la estructura de la proteína, como la presencia de un alto contenido celular de azúcares, sales u otros solutos orgánicos, que interactúan positivamente con las proteínas (Arakawa *et al.*, 2001; Chuanbin *et al.*, 1998; Guiavarc'h *et al.*, 2003; Santoro *et al.*, 1992).

En concordancia con las estrategias reportadas en la naturaleza, a nivel de laboratorio, las proteínas pueden estabilizarse por dos vías generales, sea cambiando sus características estructurales (internamente), o alterando las propiedades del entorno en contacto con éstas (externamente).

### **Mecanismos de estabilización interna**

En términos específicos, la estabilidad térmica de una proteína usualmente se incrementa si al sustituir o modificar algún aminoácido, se obtiene un aumento en la hidrofobicidad interna y una disminución de la hidrofobicidad externa de la misma (Wang, 1999). El primer factor se correlaciona con una mayor eficiencia de empaquetamiento, mientras que el segundo con una menor probabilidad de agregación por interacción con el solvente (Mathews *et al.*, 2002). Dentro de este tipo de estrategia podemos encontrar la mutagénesis inducida (o dirigida) y la modificación química.

#### Mutagénesis dirigida

Este mecanismo se refiere a la capacidad de realizar sustituciones de aminoácidos en sitios específicos de una proteína (Manning *et al.*, 1989). Los aminoácidos presentan diferentes valores de estabilidad a temperaturas elevadas; además, cada aminoácido puede ser susceptible a diferentes reacciones de degradación (Jaenicke, 2000). En este sentido, al reemplazar alguno de estos aminoácidos susceptibles, se puede alcanzar o aumentar la estabilidad de la proteína (Manning *et al.*, 1989; Wang, 1999).

En relación con este método de estabilización, los principales enfoques que han optado por la sustitución de aminoácidos han sido orientados en varios sentidos: aumentar la eficiencia del empaquetamiento, mejorar las interacciones internas, introducir uniones disulfuro adicionales y crear nuevos sitios de unión de iones (Manning *et al.*, 1989). Un caso muy específico se presenta con la agregación proteica, ya que el balance entre áreas hidrofóbicas expuestas y encerradas es tan delicado que un cambio de un solo aminoácido puede llevar a alterar de manera sustancial el patrón de agregación de la proteína (Wang, 1999).

#### Modificación química

Como consecuencia de los inconvenientes de la mutagénesis inducida, otra alternativa de estabilización se refiere a bloquear ciertos grupos funcionales de las proteínas, los cuales pueden ser vulnerables a ciertas reacciones de

degradación. Dicho bloqueo se puede alcanzar al acoplar péptidos y proteínas con lípidos o polietilenglicol (Wang, 1999). En forma adicional, también se pueden modificar los residuos básicos en proteínas por métodos químicos, como la conversión de lisina a homoarginina por medio de la guanidinación (Manning *et al.*, 1989).

#### **Mecanismos de estabilización externa**

En el caso de proteínas en solución, este tipo de estrategia se rige por dos principios básicos: fortalecer las fuerzas que estabilizan las proteínas y desfavorecer el estado desnaturalizado (Arakawa *et al.*, 1991), mediante la manipulación de las propiedades del solvente en que se encuentra inmersa la proteína (Manning *et al.*, 1989). Al respecto, el método más común consiste en adicionar osmolitos al formulado, donde ejercen su efecto estabilizante, a la vez que retardan ciertos procesos de degradación química (Manning *et al.*, 1989; Wang, 1999). Este efecto es dependiente de la concentración, por lo que por lo general, los aditivos se emplean en concentraciones mayores a 0.3 M (Wang, 1999).

En el caso particular de proteínas liofilizadas (estado sólido), los aditivos utilizados presentan dos mecanismos separados de estabilización, uno termodinámico y el otro dinámico, los cuales en conjunto, determinan su capacidad de preservar la estructura de las proteínas (Pikal, 2002). La estabilización termodinámica se da en términos de reemplazamiento del agua, sustituyendo la unión del agua con la proteína por medio de puentes de hidrógeno, que se sabe, promueve una conformación nativa. La estabilización dinámica ocurre por medio de la capacidad de ciertos carbohidratos de formar una matriz vítrea alrededor de la proteína, la cual disminuye la capacidad de movilidad molecular (Allison *et al.*, 1999; Arakawa *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 2005a; Cicerone *et al.*, 2005; Pikal, 2002; Taylor y Zografi, 1998).

Dentro de los compuestos que exhiben estas propiedades y que pueden ser utilizados para este fin se encuentran azúcares, como la sacarosa y la trehalosa; polioles, principalmente el manitol y el sorbitol; surfactantes como el Tween; sales, como por ejemplo el cloruro de sodio o de potasio; polietilenglicoles (PEGs); iones metálicos, generalmente calcio, magnesio y zinc; aminoácidos, sobretudo histidina y glicina; y algunos polímeros como el dextrano (Arakawa *et al.*, 2001; Bhat y Timasheff, 1992; Manning *et al.*, 1989;

Timasheff, 2002; Xie y Timasheff, 1997; Wang, 1999). De manera complementaria, también se ha reportado el uso de proteínas resistentes al estrés, como una alternativa indirecta para la estabilización térmica de proteínas en sistemas celulares conocidos como el de *Drosophila* (Minton *et al.*, 1982).

### Funcionamiento de los osmolitos en solución

El efecto específico que provoca que los osmolitos mencionados puedan estabilizar una proteína aún se desconocen, en especial cuando se habla de formulados acuosos. La estabilización *in vitro* de proteínas por parte de osmolitos al parecer, ocurre de forma similar a los medios utilizados por los organismos adaptados a condiciones extremas, para estabilizar sus macromoléculas (Arakawa *et al.*, 2001). Estos organismos acumulan una variedad de compuestos, para aumentar la presión osmótica del citoplasma o servir como crioprotectores. Tales compuestos no perturban las funciones biológicas de las macromoléculas y también funcionan como estabilizadores de proteínas (Allison *et al.*, 1999; Arakawa *et al.*, 2001; Taylor y Zografi, 1998).

En distintos procesos de experimentación, se ha observado que existe una deficiencia del osmolito estabilizante alrededor de la proteína, y que ésta se encuentra preferencialmente hidratada (Manning *et al.*, 1989; Maury *et al.*, 2004; Roy y Gupta, 2004; Shimizu y Chan, 2001; Timasheff, 2002). Esto quiere decir que los osmolitos son preferencialmente excluidos del contacto con la superficie de la proteína. La presencia de estos compuestos en una solución proteica crea una situación termodinámicamente desfavorable, ya que el potencial químico tanto de la proteína como del aditivo se incrementa (Petersen *et al.* 2004; Timasheff, 2002). Como consecuencia, la estructura nativa de las proteínas se estabiliza, porque la desnaturalización o disociación de las mismas, generan una superficie de contacto mucho mayor para el solvente, y por tanto, aumentan el efecto termodinámicamente desfavorable mencionado (González *et al.*, 1995; Sola y Meyer, 1998; Timasheff, 2002; Xie y Timasheff, 1997).

El proceso de desplegamiento de una proteína puede describirse como un paso de transición entre los estados plegado y desplegado, ya que cualquier forma intermedia es sumamente inestable y solo existiría en cantidades despreciables (Wang, 1999). Asumiendo esta aseveración, se puede establecer la siguiente reacción en equilibrio:  $N \rightleftharpoons D \rightarrow D'$ ; donde N y D representan

respectivamente la forma nativa y desnaturalizada de una proteína, y D' el producto de una reacción irreversible, como la agregación provocada por la alta temperatura (Timasheff, 2002). En este caso, se espera que los osmolitos desplacen el equilibrio hacia la forma nativa, de manera que se retarde el proceso de desnaturalización (Figura 3).

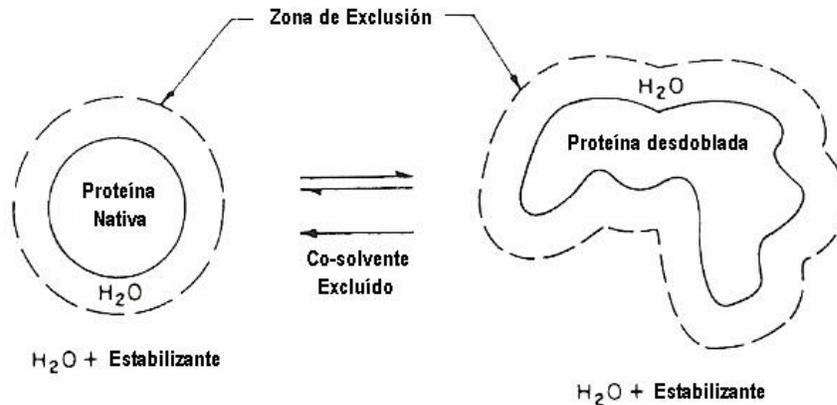


Fig. 3. Esquema de la interacción preferencial de una proteína con un osmolito estabilizante de proteínas (Tomado y modificado de Arakawa *et al.*, 2001).

Los investigadores Lee y Timasheff (1981), presentan una explicación complementaria sobre el efecto de los estabilizantes, en relación con el aumento que éstos provocan en la tensión superficial del agua. La tensión superficial de un líquido es la cantidad de energía necesaria para aumentar su superficie por unidad de área. Esta definición implica que el líquido presenta una resistencia para aumentar su superficie, lo cual podría relacionarse directamente, con el aumento de superficie por un fenómeno como el desdoblamiento o desnaturalización de una proteína (Sola y Meyer, 1998). Además, aquellas sustancias que aumentan la tensión superficial son mantenidas lejos de la superficie de la proteína (Wang, 1999), lo cual refuerza la teoría de la exclusión preferencial.

En términos de un fenómeno desnaturalizante como la aplicación de temperaturas elevadas, las proteínas se despliegan por arriba de ciertos valores térmicos (Pereira, 1999). Durante este proceso, la temperatura a la que el 50% de las moléculas de proteína están desdobladas se define como la temperatura de desdoblamiento ( $T_m$ ), que también se conoce como

temperatura de desnaturalización o transición (Wang, 1999). Por lo tanto, entre más alta la  $T_m$ , mayor será la resistencia térmica de una proteína (Pereira, 1999).

Bajo esta visión, por medio del estudio de las curvas de transición térmica de una proteína, se puede determinar la temperatura a la cual los estados desnaturalizado y nativo se encuentran en equilibrio (Pereira, 1999). Un ejemplo muy concreto se presenta en el trabajo de Xie y Timasheff (1997), donde se demuestra el potencial del sorbitol como estabilizante térmico, ya que la presencia de este compuesto aumenta la  $T_m$  de la ribonucleasa A.

Numerosas investigaciones son consistentes en el hecho de que la estabilización mediada por osmolitos, en especial por azúcares y alcoholes polihídricos, está determinada por el cambio en las interacciones preferenciales durante la reacción de desdoblamiento de las proteínas (Lee y Timasheff, 1981; Timasheff, 2002). A 20 °C, la proteína está idénticamente hidratada, pero cuando se aumenta la temperatura (48 °C o más) éste parámetro varía. En el estado desdoblado, la proteína se mantiene preferencialmente hidratada, pero en la forma nativa, la hidratación preferencial cambia a unión preferencial del aditivo. Este efecto se puede examinar a través del potencial químico de la proteína y el solvente. Para la proteína nativa a 20 °C y la proteína desnaturalizada a 48 °C, existe una interacción termodinámicamente desfavorable entre la proteína y el osmolito, mientras que para la proteína nativa, a 48 °C, ocurre lo mismo pero con una cantidad muy baja del estabilizante, por lo que el aumento en dicha concentración torna la interacción termodinámicamente favorable (Lee y Timasheff, 1981; Timasheff, 2002; Vermeer y Norde, 2000; Xie y Timasheff, 1997).

#### **Beneficios adicionales de los osmolitos**

De manera generalizada, la mayoría de los osmolitos empleados como estabilizantes de proteínas, también mejoran la apariencia y la estabilidad a mediano o largo plazo en el momento del almacenamiento, lo cual es más evidente cuando se emplean en productos liofilizados, en cuyo caso, adicionalmente mejoran la estructura física y disminuyen la humedad residual del formulado final, lo cual puede incidir en la estabilidad y funcionalidad del producto (Cicerone *et al.*, 2005; Theakston *et al.*, 2003).

Otra implicación importante del uso de estabilizantes en proteínas liofilizadas se refiere a la funcionalidad de la proteína. Se sabe que la función biológica de las proteínas depende de su estructura tridimensional, la cual está determinada en mayor medida por el agua. En el caso de los liofilizados, la remoción del agua puede llevar a la pérdida de dicha función, por lo que los osmolitos utilizados permiten mantener la capacidad de toda proteína de poder recuperar su función biológica, esto al momento de la rehidratación (Allison *et al.*, 1999; Roy y Gupta, 2004).

Por último, en el caso de las enzimas, osmolitos como los mencionados presentan propiedades particularmente interesantes. Al respecto, la utilidad de las enzimas termoestables es indiscutible, permitiendo el desarrollo de una gran variedad de técnicas de gran relevancia como la PCR (Carninci *et al.*, 1998). Sin embargo, el aislamiento de este tipo de enzimas por lo general, se ha visto restringido a aquellas existentes en organismos termofilicos. No obstante, por medio de la termoestabilización mediada por azúcares, se ha podido ampliar la disponibilidad de estas enzimas (Lai y Topp, 1999). Además, como efecto adicional, se ha observado que en algunos casos, la adición de estos compuestos produce termoactivación, es decir, la enzima puede aumentar su actividad aún a temperaturas elevadas (Carninci *et al.*, 1998).

## **OBJETIVOS**

---



### **OBJETIVO GENERAL**

La investigación desarrollada se plantea como objetivo general:

Desarrollar una metodología biotecnológica, para la estabilización térmica de las inmunoglobulinas de los sueros antiofídicos producidos por la División de Producción del Instituto Clodomiro Picado.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

A partir del objetivo general planteado, se pretende la consecución de los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar una metodología sencilla y de bajo costo, que constituya un aporte a la eficiencia del protocolo de producción vigente en el Instituto Clodomiro Picado.
2. Probar diferentes tipos y cantidades de osmolitos para lograr la estabilización térmica de las inmunoglobulinas durante el proceso de producción de sueros antiofídicos.
3. Determinar cuál es el agente estabilizante más apropiado en términos de eficacia, disponibilidad y costo, para ser implementado en el actual esquema de producción del Instituto.

## **METODOLOGIA**



### **ENSAYO DE PASTEURIZACION**

En una etapa inicial del proceso, se realizaron dos ensayos de pasteurización, uno para muestras de suero líquido polivalente y otro para muestras de plasma polivalente, ambos producidos por el Instituto Clodomiro Picado como parte del esquema de producción ordinario de la institución.

En ambos ensayos se aplicaron tres osmolitos diferentes: glicina, manitol y sorbitol, en concentraciones variables para cada uno (Cuadro 1). Para ello, se mezcló la cantidad correspondiente de cada osmolito con las soluciones de inmunoglobulinas y se dispensó en frascos de vidrio estériles de 10 ml, sellados con un cierre elastomérico y retapa metálica. En total, se contabilizaron sesenta frascos para cada ensayo, de los cuales se dispuso de dieciocho frascos por tratamiento (concentración del osmolito) y seis frascos adicionales como control, los cuales contenían solamente la solución de suero o plasma.

Cuadro 1. Cantidad de osmolito empleada para los diferentes ensayos de pasteurización.

<i>Ensayo</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Concentración (M)</i>	<i>Cantidad (g/l)</i>
Suero líquido polivalente	Sorbitol	0.2	3.64
		0.5	9.11
		1.0	18.22
	Manitol	0.2	3.64
		0.5	9.11
		0.8	14.57
	Glicina	0.2	2.40
		0.6	7.21
		1.0	12.01
Plasma equino polivalente	Sorbitol	1.0	29.15
		1.4	40.81
		1.8	52.47
	Manitol	0.2	5.83
		0.5	14.57
		0.8	23.32
	Glicina	1.0	12.01
		1.5	18.02
		2.0	24.02

Los frascos se colocaron en bandejas de plástico en un horno convencional a  $60\pm 2$  °C durante diez horas (Theakston *et al.*, 2003). El método de muestreo para todos los ensayos consistió en extraer del horno tres frascos de cada concentración y un frasco control cada dos horas del proceso, incluyendo el inicio del ensayo. Una vez extraídas las muestras correspondientes, éstas se dejaron enfriar por veinte minutos a temperatura ambiente, para ser almacenadas seguidamente en un refrigerador a una temperatura de  $7.0\pm 0.5$  °C.

Posteriormente, se realizó un tercer ensayo de pasteurización con el mismo procedimiento de los anteriores, pero solo para suero líquido y empleando sorbitol como único osmolito. En este caso, las concentraciones que se emplearon fueron de 1.0, 1.5 y 2.0 M.

#### **MEDICION DE TURBIDEZ**

Esta medición se realizó solamente para las muestras de suero líquido con sorbitol del segundo ensayo de pasteurización. Para ello, se colocaron 10 ml de las diferentes muestras en la celda de lectura de un turbidímetro (La Motte, Turbidimeter 2020), con tres repeticiones para cada una, y se registró el resultado de cada medición.

#### **DETERMINACION DE PROTEINA TOTAL**

Para esta determinación se empleó el método de Biuret. Se tomaron 50 µl de la solución de inmunoglobulinas correspondiente y se mezcló con 2.5 µl de reactivo de Biuret en un tubo de ensayo. Se agitó ligeramente y se incubó en un horno a  $37.0\pm 0.2$  °C durante diez minutos. Este procedimiento se realizó por triplicado, con un tubo adicional como control conteniendo solamente 2.5 µl de reactivo de Biuret. Concluido el tiempo de incubación, se realizó la lectura respectiva de las muestras en un espectrofotómetro (Shimadzu, UV-Vis Spectrophotometer) a 540 nm. Esta determinación se realizó para las muestras antes de someterlas al proceso de pasteurización y después de las diez horas de calentamiento

Debe mencionarse que para todas las muestras pasteurizadas, se emplearon los sobrenadantes de las mismas. Para esto, se tomó 1 ml de cada solución en un tubo Eppendorf de 2 ml de capacidad, se centrifugó a 14000 rpm durante

15 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga (Ependorff, Centrifugue 5413C), se extrajo el sobrenadante y se almacenó en refrigeración hasta su utilización.

#### **DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS**

Para obtener esta información se utilizó el método inmunoenzimático ELISA, cuyo procedimiento se describe a continuación. Se recubrió una placa de polipropileno para ELISA de 96 hoyos (100 µl por hoyo) con una solución de veneno de *Bothrops asper* (mezcla en partes iguales de las variedades Atlántico y Pacífico) en una proporción de 2µg de veneno por cada 100µl de solución. Se incubó por 24 horas a temperatura ambiente; finalizado dicho período se procedió a decantar el antígeno no adherido a la placa.

A continuación, se bloquearon los sitios libres (post-coating) con leche bovina al 2% preparada en PBS (solución salina amortiguadora), colocando 100 µl por hoyo e incubando durante 1 hora. Se lavó cuatro veces con PBS.

Las muestras a analizar se prepararon por triplicado en diluciones directas independientes de 1/1000, agitando por 10 o 12 segundos en un agitador orbital (vortex). Cada muestra se cargó por triplicado (100 µl por hoyo), agitando ligeramente antes de adicionarlas y se incubó a temperatura ambiente por una hora. Luego, se lavó y secó la placa como se describió antes. En adición, para todas las pruebas se incluyó una muestra de suero normal equino (SNE) como control negativo, el cual corresponde a suero obtenido de caballos que no fueron inmunizados con veneno.

El conjugado utilizado consistió en suero de conejo anti-IgG equino marcado con peroxidasa, diluido 1/5000 en leche bovina al 2% (igual al post-coating), cargándose 100 µl en cada hoyo de la placa. Se volvió a incubar a temperatura ambiente por una hora y se lavó de nuevo la placa con PBS. El sustrato para la peroxidasa se preparó con 2 mg/ml de o-fenilendiamina (OPD), amortiguador de sustrato (Citrato de Sodio) y peróxido de hidrógeno al 30%, éste último en una proporción de 4 µl por cada 10 ml de sustrato; se adicionaron 100 µl por hoyo en la placa y se incubó hasta obtener un color amarillo fuerte. La reacción se detuvo con 50 µl por hoyo de HCl 2 M.

La absorbancia se determinó en un lector de ELISA (Labsystems, Multiscan RC) agitando brevemente por unos segundos y leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm. La prueba se llevó a cabo en repetidas ocasiones, siguiendo en todos los casos el procedimiento presentado. Es importante señalar que, cuando fue posible, se emplearon los sobrenadantes de las muestras, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

## ANALISIS DE AGREGADOS

Para visualizar la formación de agregados se recurrió a las técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y la cromatografía líquida para proteínas (FPLC), cuyos procedimientos se exponen a continuación.

### Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para la preparación del gel separador o inferior se mezclaron los diferentes reactivos según el porcentaje del gel deseado (Cuadro 2); en el presente trabajo se utilizaron geles al 7.5% para muestras sin reducir y al 12% para muestras reducidas.

Cuadro 2. Componentes necesarios para la preparación de la parte inferior de un gel para SDS-PAGE (3.5 ml, 0.75 mm de grosor).

<i>Componente</i>	<i>Concentración final</i>		
	<i>7.5 %</i>	<i>12%</i>	
Agua desionizada	4057.2	2885.8	μl
Amortiguador separador	2142.8	2142.8	μl
SDS	85.6	85.6	μl
Acilamida/bisacilamida	2142.8	3428.6	μl

Nota: cantidades corresponden a la preparación de dos geles.

Una vez mezclados los componentes, se inició la polimerización agregando 6 μl de TEMED y 40 μl de persulfato de amonio. Inmediatamente, se mezcló en forma vigorosa y se vertió la solución en el molde de vidrio de la cámara de electroforesis (alrededor de 3.5 ml). A continuación, se eliminó la curvatura en la superficie depositando una capa delgada de agua destilada (de 1 a 2 mm), y se dejó polimerizando por 50 minutos a temperatura ambiente.

Cuadro 3. Componentes necesarios para la preparación de la parte superior de un gel para SDS-PAGE.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad (μl)</i>
Agua desionizada	1285.6
Amortiguador espaciador	475.0
SDS	25.0
Acrilamida/bisacrilamida	250.0
TEMED	1.6
Persulfato de Amonio	7.6

Nota: cantidades corresponden a la preparación de dos geles.

Concluido el tiempo de polimerización y asegurándose que la interfase entre el polímero y el agua fuera claramente visible, se procedió a decantar el exceso de líquido en la superficie, se colocaron los peines para las muestras, y se preparó la mezcla para el gel superior o compactador (Cuadro 3).

Después de adicionar los catalizadores de reacción, se mezcló y vertió de inmediato en el molde, evitando en todo momento la formación de burbujas. Una vez polimerizados ambos geles y después de remover cuidadosamente el peine, se realizaron de 6 a 8 lavados con amortiguador de cámara, asegurándose de eliminar todo rastro de acrilamida.

La preparación de las muestras fue diferente cuando se adicionaron en forma no reducida o reducida. Para el primer caso, se prepararon en amortiguador de muestra no reductor (2x), mezclando 10 μl de ambos componentes; en cada pozo del gel se cargaron 1.25 μl de muestra, de manera que en cada carril se adicionaban aproximadamente 25 μg de proteína (determinación con base en la cantidad de proteína total del suero). En el caso de las muestras reducidas, el procedimiento fue similar, pero empleando amortiguador reductor (2x), y colocando las muestras por 5 minutos en un baño de agua a ebullición, antes de cargar en el gel. Al igual que para las pruebas de ELISA, en este caso se emplearon los sobrenadantes de las muestras, los cuales se obtuvieron siguiendo el mismo proceso antes mencionado. En última instancia, se empleó un marcador de alto peso molecular (Cuadro 4) para los geles al 7.5 %, y un marcador de bajo peso molecular (Cuadro 5) para los geles al 12 %; cargando 6 μl en ambos casos.

La cámara de electroforesis se llenó con amortiguador de cámara y el proceso se llevó a cabo a 180 V (voltaje constante) hasta que el azul de bromofenol llegara al borde inferior del gel (alrededor de 60 minutos).

Completado este paso, se procedió a sacar el gel del molde y se sumergió en una solución fijadora (metanol y ácido acético glacial) durante 15 minutos en un recipiente cerrado y con agitación ligera. Luego se eliminó esta solución y se tiñó con azul de Coomassie por varias horas. Finalmente, se decantó el exceso de colorante y se realizaron varias adiciones de una solución decoloradora (metanol, etanol y ácido acético).

Cuadro 4. Marcador de alto peso molecular empleado para el SDS-PAGE.

<i>Componente</i>	<i>Peso molecular (kDa)</i>	<i>Origen</i>
Miosina	212	Músculo de ratón
$\alpha_2$ macroglobulina	170	Plasma bovino
$\beta$ -galactosidasa	116	<i>E. coli</i>
Transferrina	76	Humano
Deshidrogenasa glutámica	53	Hígado bovino

Fuente: Amershan Pharmacia Biotech Inc. (2004).

Cuadro 5. Marcador de bajo peso molecular empleado para el SDS-PAGE.

<i>Componente</i>	<i>Peso molecular (kDa)</i>
Fosforilasa B	94.0
Albúmina	67.0
Ovoalbúmina	43.0
Anhidrasa carbónica	30.0
Inhibidor tripsina	20.1
$\alpha$ -lactoalbúmina	14.4

Fuente: Amershan Pharmacia Biotech Inc. (2004).

### Cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC)

Se empleó un sistema de FPLC (Pharmacia Biotech) y una columna de filtración en gel para FPLC (Superdex 200). Solamente se analizaron las muestras de suero líquido con sorbitol correspondientes al segundo ensayo de pasteurización (dilución 1/100, volumen de inyección de 2ml). Tanto estas últimas como el amortiguador de corrida (solución salina PBS), fueron filtradas en membranas con un poro de 0,22 micrómetros antes de

adicionarlas al sistema. El proceso en sí se llevó a cabo con un flujo de corrida de 0.4 ml por minuto, bajo una presión de entre 1.0 y 1.5 MPa, y con una sensibilidad de lectura de 0.1 UA. Los resultados se registraron por medio de detección ultravioleta a 280nm.

#### **ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA**

Para este fin se empleó la técnica de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR). Para obtener el espectro de absorción del infrarrojo, se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer. Las muestras se colocaron en una celda de cloruro de cesio y se registró el porcentaje de transmitancia frente al número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). La segunda derivada de los espectros de infrarrojo se obtuvo suavizando la función con 25 puntos.

## RESULTADOS



### ENSAYO DE PASTEURIZACION

La evolución de las muestras durante el proceso de pasteurización para los dos primeros ensayos se ilustran en las figuras 4 y 5. Para cada fotografía de izquierda a derecha se muestra el control (primer frasco) y las muestras en concentración ascendente del osmolito respectivo.

	<i>Tiempo Inicial</i>			<i>Tiempo Final</i>		
<b>Sorbitol</b>	0.2 M	0.5 M	1.0 M	0.2 M	0.5 M	1.0 M
<b>Manitol</b>	0.2 M	0.5 M	0.8 M	0.2 M	0.5 M	0.8 M
<b>Glicina</b>	0.2 M	0.6 M	1.0 M	0.2 M	0.6 M	1.0 M

Fig. 4. Apariencia de las muestras después de 10 horas de calentamiento a 60 °C para el primer ensayo con suero líquido polivalente.

En las muestras con suero líquido, para el sorbitol y el manitol se evidenció un patrón muy similar aunque en términos generales, se observó a simple vista, una menor turbidez en cada una de las muestras del primero, en especial después de las 10 horas de calentamiento. Para las muestras que contenían glicina, se observó la mayor turbidez (en comparación con los dos azúcares), la cual fue evidente a partir de las seis horas de calentamiento para los tres niveles de concentración probados.

	<i>Tiempo Inicial</i>			<i>Tiempo Final</i>		
<b>Sorbitol</b>	1.0 M	1.4 M	1.8 M	1.0 M	1.4 M	1.8 M
<b>Manitol</b>	0.2 M	0.5 M	0.8 M	0.2 M	0.5 M	0.8 M
<b>Glicina</b>	1.0 M	1.5 M	2.0 M	1.0 M	1.4 M	1.8 M

Fig. 5. Apariencia de las muestras después de 10 horas de calentamiento a 60 °C para el ensayo con plasma equino polivalente.

En el ensayo de pasteurización empleando plasma, el deterioro de las muestras a lo largo de las 10 horas de calentamiento fue más evidente que para el suero líquido. Se puede destacar que las muestras que contenían sorbitol fueron las que, al menos en términos visuales, se mantuvieron ligeramente menos modificadas, ya que las demás mostraron una apariencia casi idéntica a la de las muestras control que no contenían osmolito (líquido viscoso, denso y de coloración blanca).

De manera adicional, en el caso de las muestras de suero con glicina, cinco días después de concluido el ensayo de pasteurización y de estar almacenadas en refrigeración, se detectó la formación de varias estructuras cristalinas en la solución (Figura 6), lo cual se evidenció para todas las concentraciones utilizadas, en mayor medida para la concentración de 1.0 M.

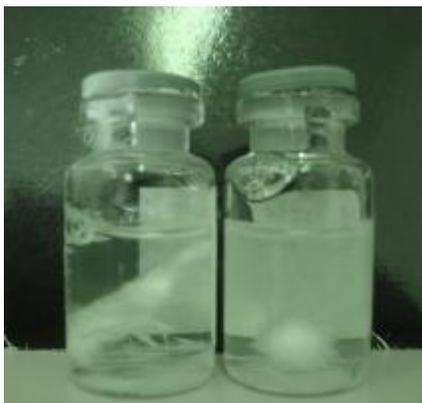


Fig. 6. Estructuras cristalinas en las muestras de suero líquido polivalente con glicina 0.6 M.

Por último, se reporta el estado de las muestras para el tercer ensayo de pasteurización (Figura 7). Tal como se mencionó en la metodología, en este caso solo se empleó sorbitol como osmolito para suero líquido, en las concentraciones de 1.0, 1.5 y 2.0 M. Al igual que en las fotografías anteriores, en orden de izquierda a derecha, se ubican el control y las muestras con sorbitol en concentración ascendente.

A simple vista, después del calentamiento de estas muestras se denota la menor turbidez de todos los ensayos realizados, con una apariencia muy similar al suero control sin pasteurizar, lo cual es más evidente para la mayor concentración empleada.

<i>Tiempo Inicial</i>				<i>Tiempo Final</i>			
Control	1.0 M	1.5 M	2.0 M	Control	1.0 M	1.5 M	2.0 M

Fig.7. Apariencia de las muestras después de 10 horas de calentamiento a 60 °C para el segundo ensayo con suero líquido polivalente.

### MEDICION DE TURBIDEZ

Este análisis se realizó solamente para las muestras de suero líquido con sorbitol del segundo ensayo de pasteurización, y constituye un parámetro tangible para corroborar las afirmaciones anteriores de la intensidad de turbidez en las muestras (Cuadro 6). Se reporta solamente el promedio de las tres mediciones registradas para cada muestra.

Cuadro 6. Unidades nefelométricas de turbidez (NTU) de las muestras del ensayo de pasteurización con sorbitol en suero líquido polivalente.

Tiempo (horas)	Control	1.0 M	1.5 M	2.0 M
0	25	18	17	14
2	190	34	23	19
4	1000	80	45	31
6	>1000	140	67	39
8	>1000	177	85	48
10	>1000	253	109	62

Nota: la resolución máxima del turbidímetro utilizado es de 1000 NTU, con una desviación estándar de 0.2 a 5 unidades.

### DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

La cantidad de proteína presente en las muestras para los diferentes ensayos se registra en los Cuadros 7 y 8, así como una comparación de su modificación por efecto del calentamiento para las concentraciones de osmolito más eficientes en suero líquido (Figura 8). Es importante señalar que

todas las determinaciones de proteína se realizaron por triplicado por lo que en esta sección solo se incluyó el promedio ponderado de las tres mediciones.

Cuadro 7. Cantidad de proteína (g/dl) presente en las muestras durante el primer ensayo de pasteurización con suero líquido.

<i>Muestra</i>	<i>Concentración inicial</i>	<i>Concentración final</i>
Control	4.70	2.14
Sorbitol 0.2 M	4.57	3.39
Sorbitol 0.5 M	4.80	4.49
Sorbitol 1.0 M	4.97	4.85
Manitol 0.2 M	4.16	3.22
Manitol 0.5 M	4.32	3.77
Manitol 0.8 M	4.62	4.16
Glicina 0.2 M	4.32	2.48
Glicina 0.6 M	4.46	3.07
Glicina 1.0 M	4.86	3.71

Nota: Resultados con una desviación estándar de 0.14 g/dl.

Cuadro 8. Cantidad de proteína (g/dl) presente en las muestras durante el ensayo de pasteurización con plasma.

<i>Muestra</i>	<i>Concentración inicial</i>	<i>Concentración final</i>
Control	6.72	3.72
Sorbitol 1.0 M	6.09	4.75
Sorbitol 1.4 M	6.25	5.56
Sorbitol 1.8 M	6.30	5.71
Manitol 0.2 M	6.22	5.04
Manitol 0.5 M	6.45	5.42
Manitol 0.8 M	6.75	6.04
Glicina 1.0 M	6.16	4.51
Glicina 1.5 M	6.42	5.53
Glicina 2.0 M	6.64	5.89

Nota: Resultados con una desviación estándar de 0.14 g/dl.

De acuerdo con los resultados mostrados, se nota una disminución importante de la cantidad de proteína para todas las muestras con plasma, lo cual se torna más evidente en las muestras control (ausencia de osmolito). En contraposición, en el suero líquido se visualiza una mayor conservación del nivel proteico, en especial para las muestras con sorbitol 1.0 M; sobre el particular, debe recordarse que la determinación se realizó con los sobrenadantes.

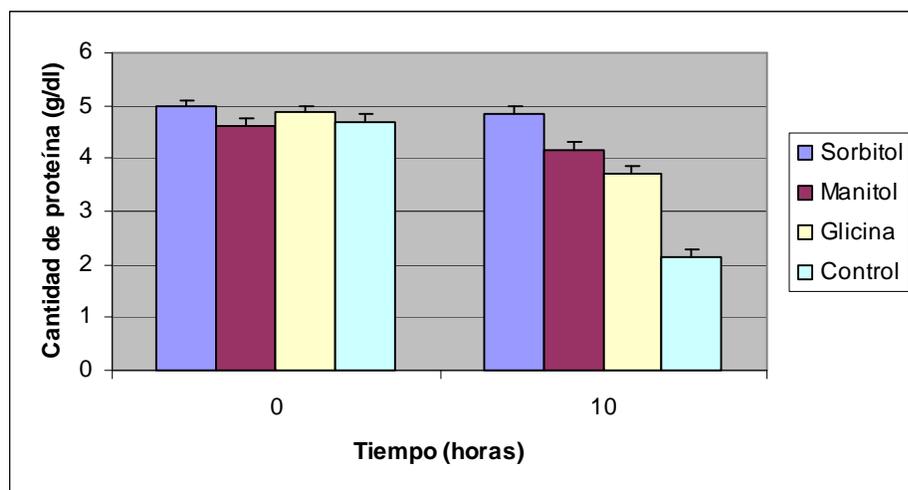


Fig. 8. Cantidad de proteína total para las muestras con mayor concentración de osmolito en suero líquido polivalente pasteurizado.

Por su parte, en el segundo ensayo de pasteurización con suero líquido, la cantidad de proteína tanto antes como después del proceso de calentamiento se mantuvo inalterada para las tres concentraciones de sorbitol ( $4.88 \pm 0.12$  g/dl de proteína) no así para el control, que pasó de una concentración inicial de  $4.64 \pm 0.12$  g/dl a una concentración final de  $2.19 \pm 0.12$  g/dl.

#### DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS

En lo que respecta al ensayo inicial de pasteurización para suero líquido, los mejores resultados se observaron para la concentración más alta de sorbitol, siendo el aditivo que logró mantener el mayor título de anticuerpos finalizado el proceso (Figura 9). Para los otros osmolitos, con base en la desviación estándar reportada, no se evidencia una diferencia significativa entre las tres concentraciones establecidas en cada caso.

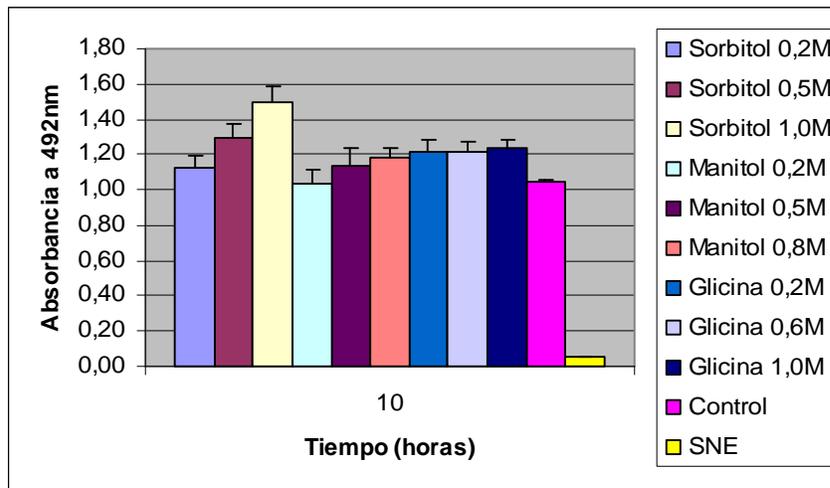


Fig. 9. Resultados de una prueba de ELISA para las diferentes concentraciones de osmolito en suero líquido al finalizar la pasteurización.

Sin embargo, en todos los casos la absorbancia a las 10 horas es menor a la reportada en el tiempo inicial, es decir, disminuye para todos los osmolitos, siendo más evidente en el control. Al respecto, tomando en cuenta la absorbancia de la muestra control antes de la pasteurización como el 100% del título de anticuerpos, se calculó el porcentaje de mantenimiento del título para las concentraciones de cada osmolito que mostraban los valores más elevados (Figura 10). De acuerdo con esta figura, se corrobora una mayor cantidad de anticuerpos en las muestras con sorbitol pasteurizadas.

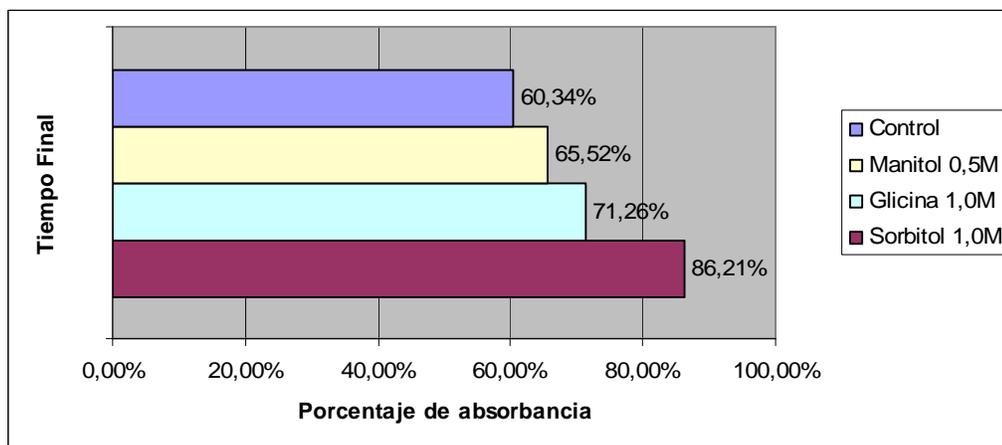


Fig. 10. Mantenimiento del título de anticuerpos por parte de cada osmolito después de la pasteurización de muestras de suero líquido polivalente.

A diferencia de los casos anteriores, en el segundo ensayo con suero líquido las tres concentraciones de sorbitol empleadas lograron mantener el título de anticuerpos inicial, no así en el caso del control, donde disminuyó en forma notoria después de aplicado el proceso de calentamiento (Figura 11). De acuerdo con la desviación estándar reportada, no se vislumbró una diferencia significativa entre las tres concentraciones.

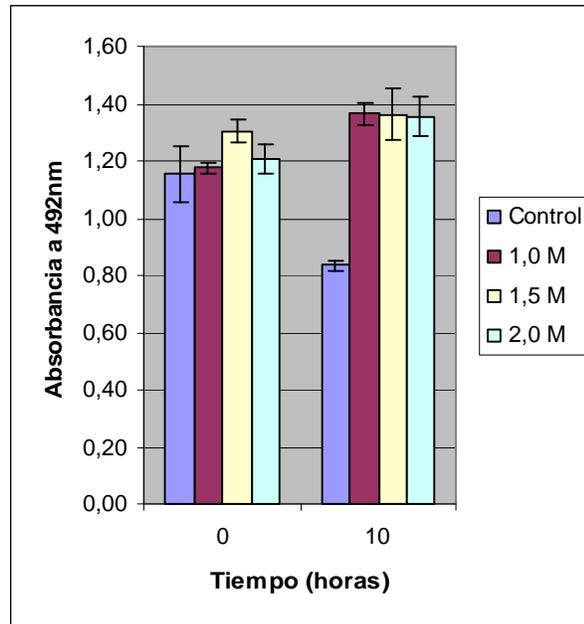


Fig. 11. Resultados de una prueba de ELISA para las diferentes concentraciones de sorbitol del segundo ensayo de pasteurización en suero líquido.

Por otro lado, en el caso del ensayo con plasma, la caída en la absorbancia reportada después de la pasteurización es mucho más pronunciada que en las muestras de suero. En este caso, ninguno de los osmolitos logró mantener el título de anticuerpos reportado en la etapa inicial. En la figura 12 se realiza un análisis similar al mostrado anteriormente, para denotar el porcentaje de absorbancia de cada muestra con respecto a la muestra control sin calentar.

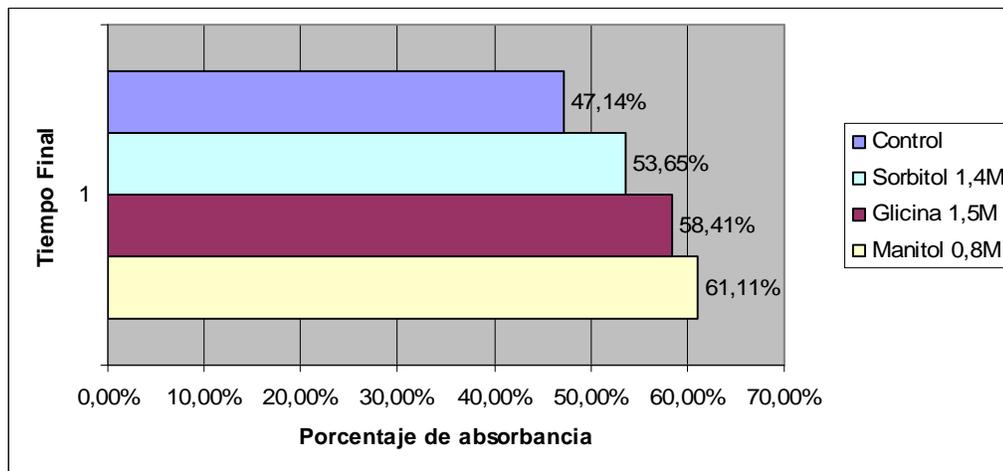


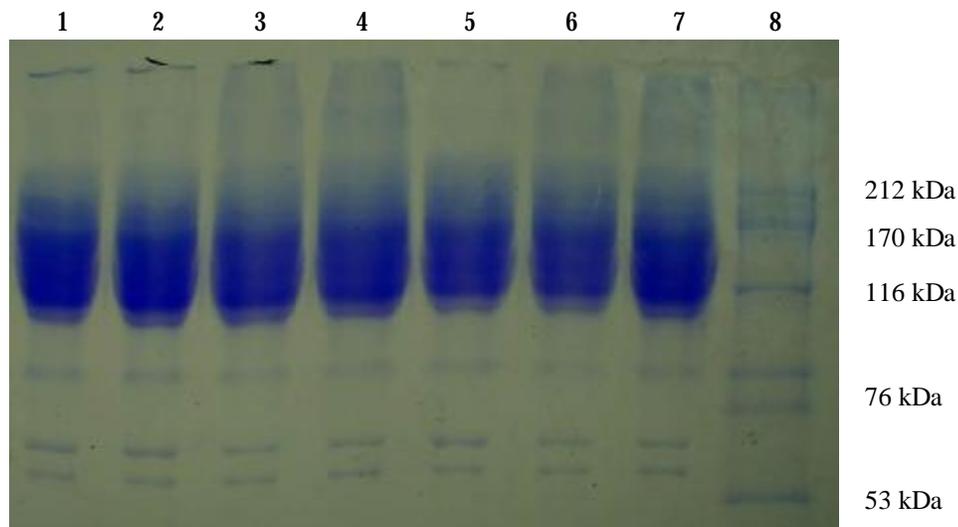
Fig. 12. Mantenimiento del título de anticuerpos por parte de cada osmolito después de la pasteurización de muestras de plasma equino polivalente.

## ANÁLISIS DE AGREGADOS

### Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

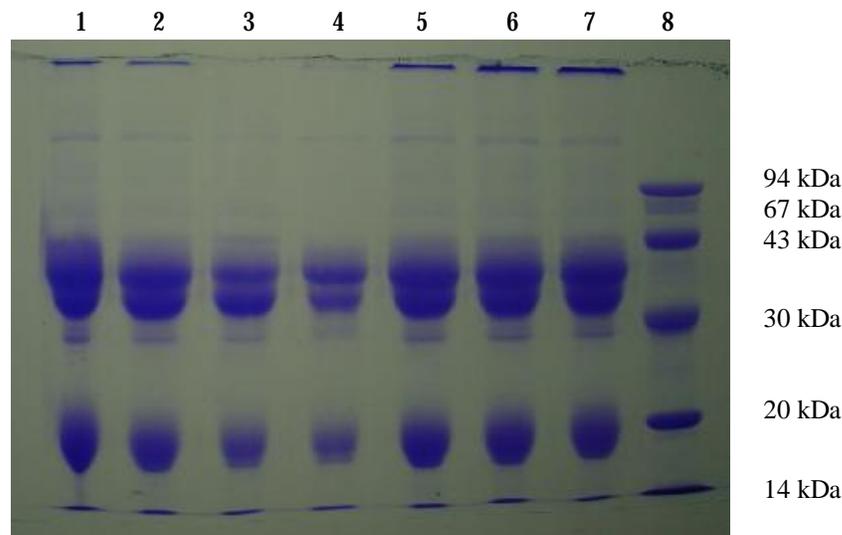
A partir del estudio del patrón electroforético obtenido para las diferentes muestras, no se visualizaron diferencias de importancia en el comportamiento de la solución después de la pasteurización. Aunque se realizaron varias electroforesis para cada caso, se mantuvo el mismo patrón descrito, de manera que en esta sección solo se incluyen algunas imágenes.

A partir de la figura 13, no se observan diferencias importantes tanto entre las muestras de suero líquido con sorbitol y manitol pasteurizadas, y éstas con respecto al control sin calentar. Al menos a simple vista, se vislumbra un ligero “barrido” (bandas difusas) al inicio de los pozos de muestras pasteurizadas, el cual no está presente en el control. Al comparar estos dos osmolitos con glicina, sucede un fenómeno similar, pero en general se sigue manteniendo el mismo comportamiento evidenciado en la fotografía anterior. No se observa tampoco la desaparición de bandas en muestras centrifugadas en ningún caso.



**Fig.13. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% para muestras no reducidas de suero con sorbitol y manitol. 1) Control sin pasteurizar, 2) Sorbitol 1.0 M sin pasteurizar, 3) Sorbitol 1.0 M pasteurizado, 4) Sorbitol 1.0 M (centrifugado) pasteurizado, 5) Manitol 0.8 M sin pasteurizar, 6) Manitol 0.8 M pasteurizado, 7) Manitol 0.8 M (centrifugado) pasteurizado, 8) Marcador de alto peso molecular.**

De manera similar, en el segundo ensayo de pasteurización para suero líquido, no se determinaron diferencias importantes entre el suero control y las muestras pasteurizadas; tampoco fue posible establecer un comportamiento distinto entre las distintas concentraciones de sorbitol empleadas. En la figura 14, se presentan las tres concentraciones en orden ascendente después de las diez horas de calentamiento. A partir de la fotografía se puede destacar la presencia de un “barrido” ligero en las muestras pasteurizadas (tal como se describió en el caso anterior) y la acumulación de un componente de alto peso molecular que no pudo atravesar el gel de separación (parte superior del pozo).



**Fig. 14.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% para muestras reducidas de suero líquido con sorbitol del segundo ensayo de pasteurización. 1) Control sin pasteurizar, 2) Control pasteurizado (sobrenadante), 3) y 4) Control pasteurizado (residuo resuspendido en PBS), 5) Sorbitol 1.0 M pasteurizado, 6) Sorbitol 1.5 M pasteurizado, 7) Sorbitol 2.0 M pasteurizado, 8) Marcador de bajo peso molecular.

Por último, para las muestras de plasma, los resultados fueron muy similares a los obtenidos en el caso del suero líquido. No se evidenciaron diferencias destacables entre los diferentes osmolitos y las concentraciones empleadas para cada uno. De manera particular, en este caso al comparar el control sin pasteurizar y las muestras que si fueron sometidas a este proceso, se produjo una menor intensidad en todas las bandas en las muestras calentadas, sin embargo, las mismas bandas del control están presentes en éstas últimas.

#### **Cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC)**

En las figuras 15, 16, 17 y 18 se muestra el patrón cromatográfico obtenido a partir de la muestra control sin pasteurizar, y las muestras pasteurizadas de sorbitol 1.0, 1.5 y 2.0 M respectivamente; tal como se mencionó en la metodología, este análisis solo se realizó para las muestras del segundo ensayo de pasteurización con suero líquido. En el caso de la muestra control pasteurizada, no fue posible obtener un resultado de este tipo, puesto que al introducir la muestra en el sistema del FPLC solamente se graficó una curva muy pequeña en el área de las inmunoglobulinas, de manera que no se incluye un gráfico como en los otros casos. La filtración en membranas de 0.22 micrómetros en este último caso fue bastante complicada, pues el filtro se bloqueaba al introducirle la muestra.

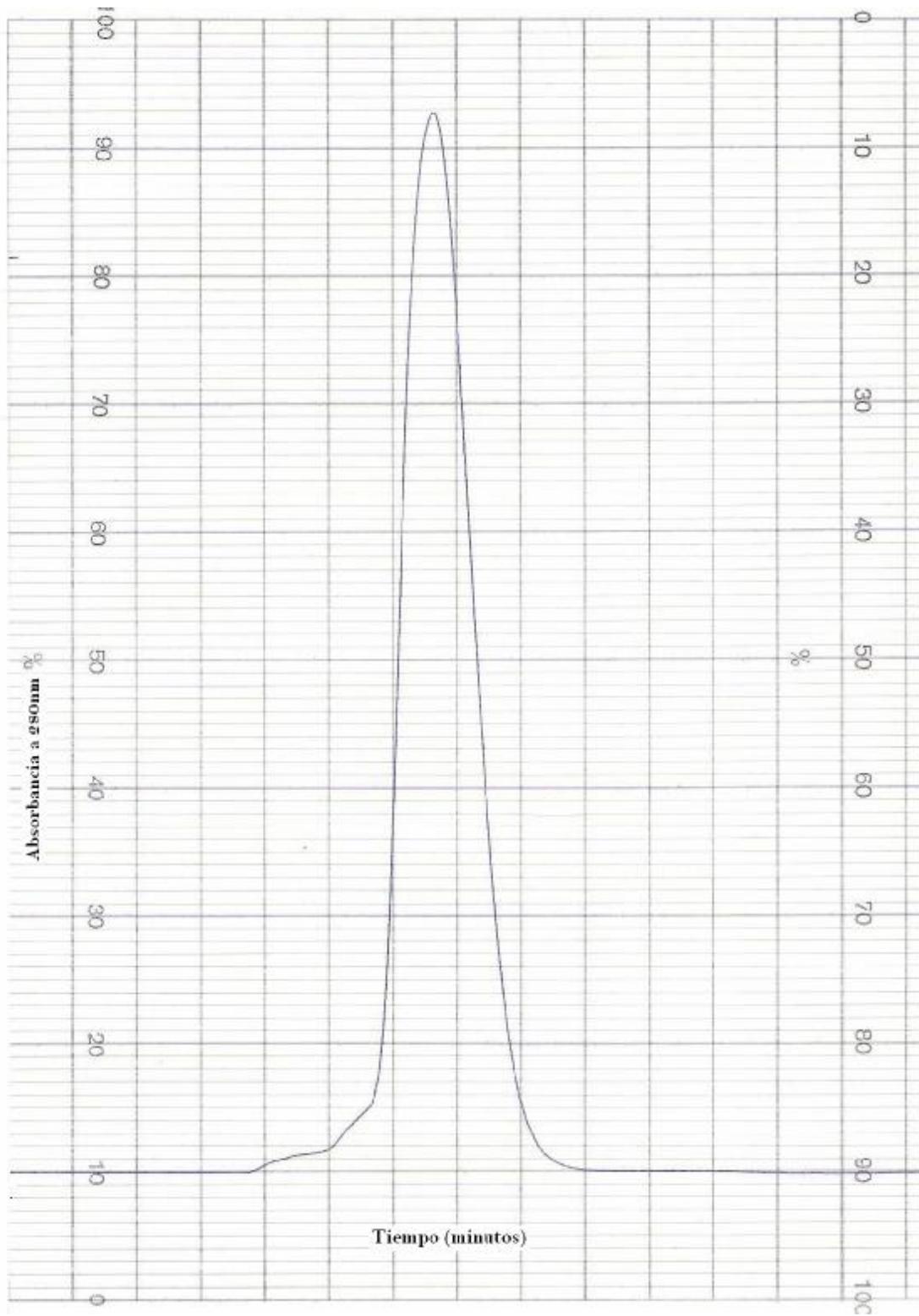


Fig. 15. Patrón cromatográfico de FPLC de una muestra control de suero líquido sin pasteurizar.

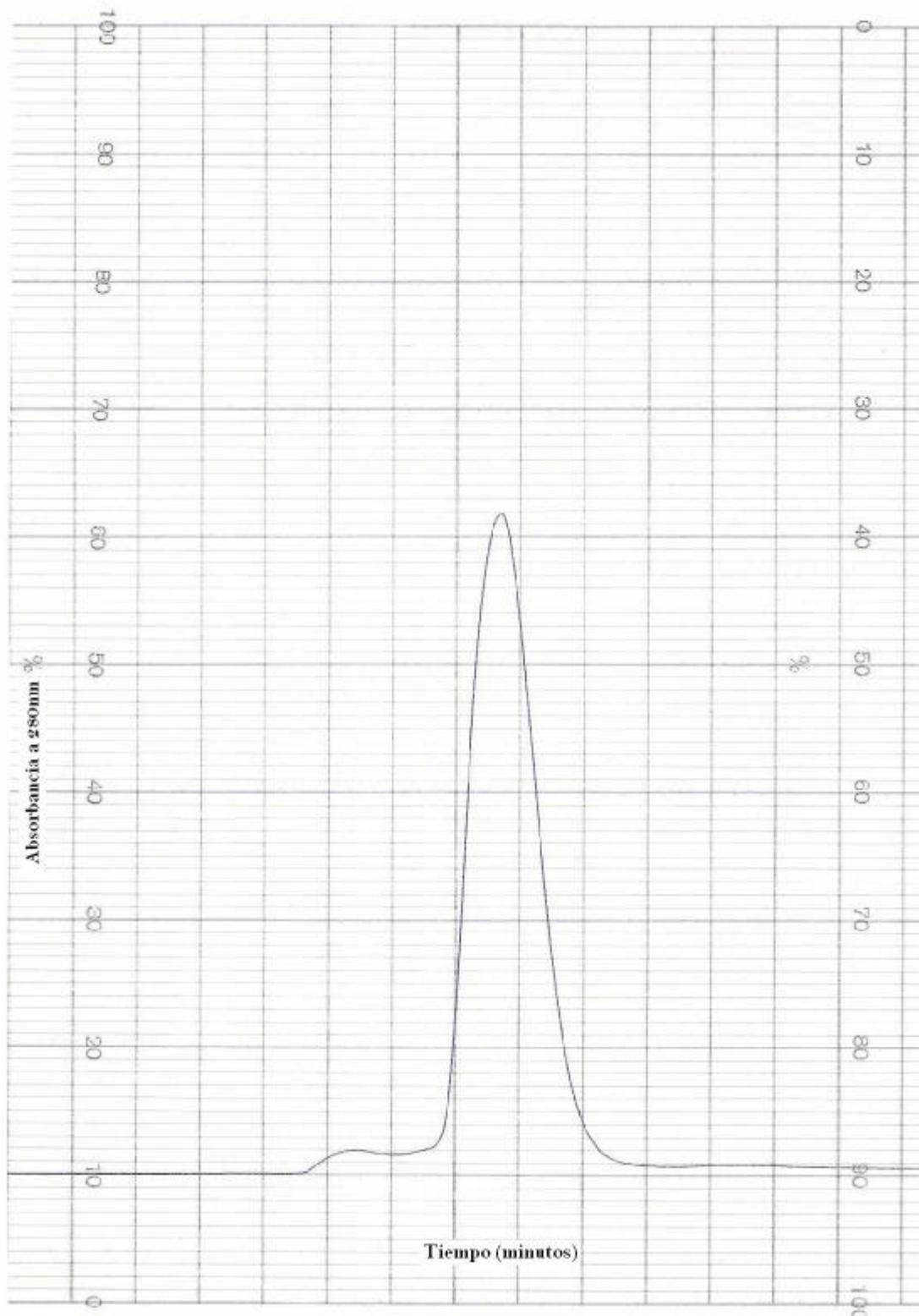


Fig. 16. Patrón cromatográfico de FPLC de una muestra de suero líquido polivalente pasteurizada con sorbitol 1.0 M.

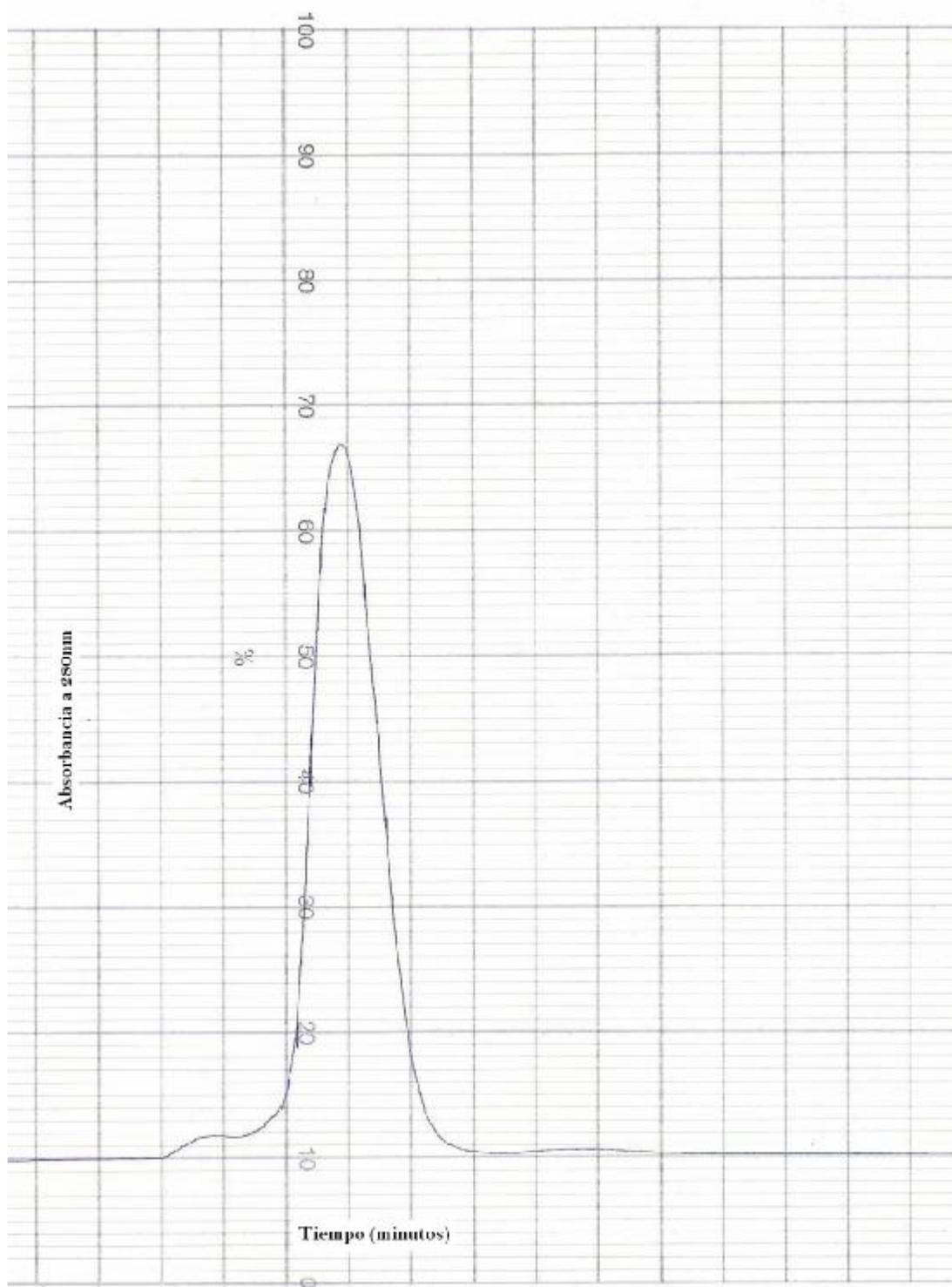


Fig. 17. Patrón cromatográfico de FPLC de una muestra de suero líquido polivalente pasteurizada con sorbitol 1.5 M.

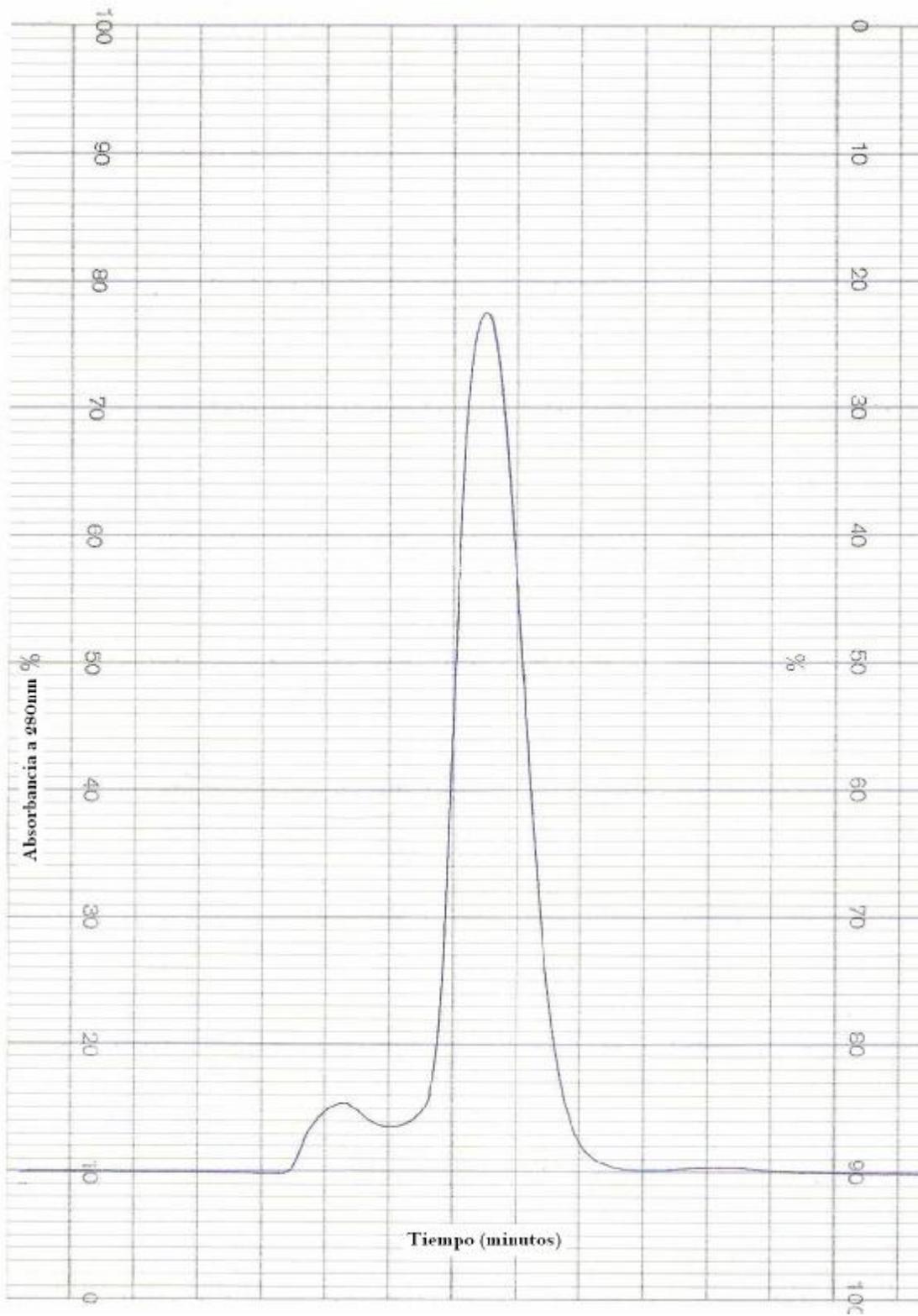


Fig. 18. Patrón cromatográfico de FPLC de una muestra de suero líquido polivalente pasteurizada con sorbitol 2.0 M.

Debido a que el proceso de FPLC corresponde a una separación por tamaño, la curva o pico que se nota de primero corresponde a agregados de alto peso molecular, mientras que el pico más grande (común para todos los casos), corresponde a monómeros de inmunoglobulina (Maury *et al.*, 2004).

Al obtener el área debajo de cada pico, es posible estimar el porcentaje de contribución de cada componente al área total de toda la curva graficada. En este sentido, el porcentaje de agregados detectados en cada caso después de la pasteurización se anotan en el cuadro siguiente, a manera de referencia se incluye también la muestra control sin pasteurizar.

Cuadro 9. Porcentaje de agregación presente en diferentes muestras de suero líquido polivalente.

<i>Muestra</i>	<i>Porcentaje de agregados</i>
Control sin pasteurizar	2.34
Sorbitol 1.0 M pasteurizado	3.41
Sorbitol 1.5 M pasteurizado	3.38
Sorbitol 2.0 M pasteurizado	3.54

## ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA

Para efectos de la presente investigación, las observaciones pertinentes se realizaron en forma cualitativa y para las muestras con sorbitol 2.0 M del segundo ensayo con suero líquido.

La figura 19a muestra la segunda derivada (región amida I) del espectro infrarrojo de una muestra control de suero líquido polivalente sin pasteurizar. En este caso, podemos señalar cinco picos destacables en 1686, 1674, 1657, 1637 y 1621  $\text{cm}^{-1}$ , que al comparar con la investigación de Maury *et al.* (2004), podemos asociar con láminas- $\beta$ . Al obtener el espectro de absorción de una muestra de suero líquido pasteurizada con sorbitol (figura 19b), comparativamente, se denota un espectro prácticamente idéntico entre ambos. Los cinco picos mencionados antes se encuentran presentes en las mismas posiciones o ligeramente desplazados una o dos unidades de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Por su parte, como se observa en la figura 20, el suero control pasteurizado registró un patrón de absorción totalmente modificado, en el que no se pueden ubicar ninguna de los picos presentes en los casos anteriores.

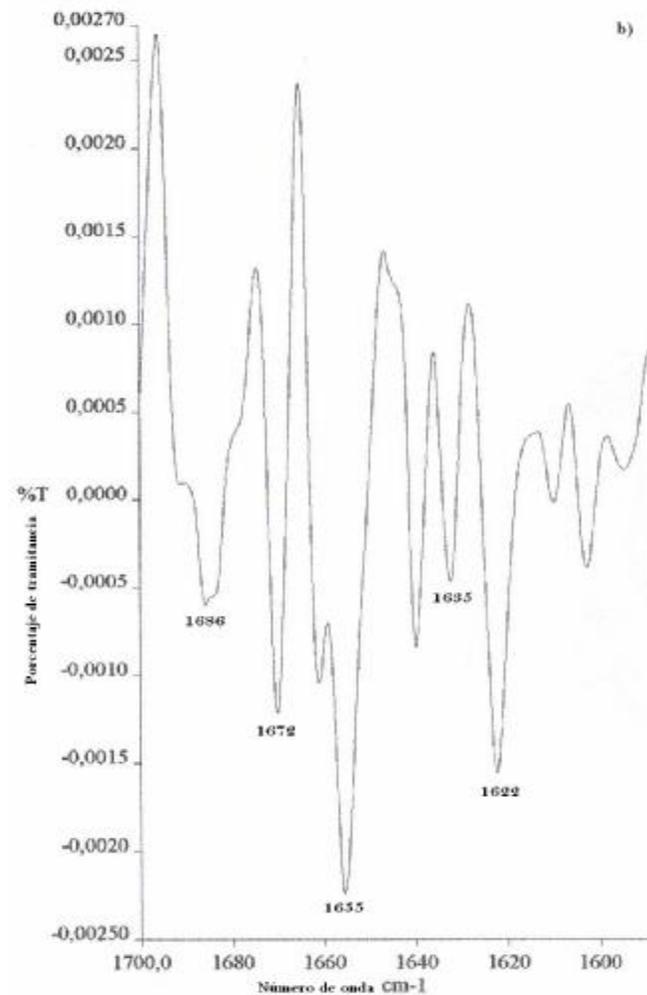
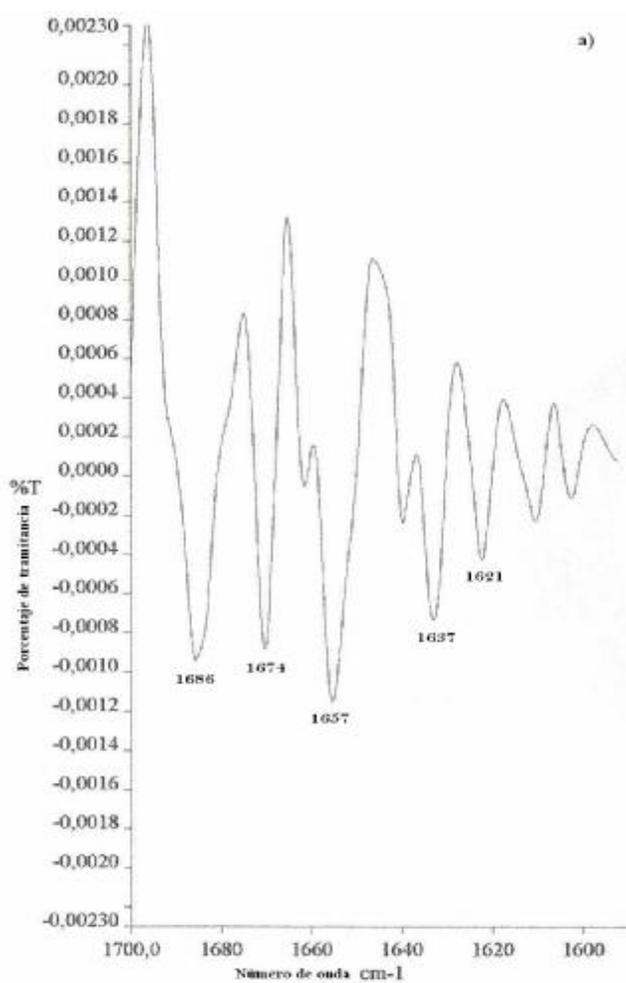


Fig. 19. Espectro infrarrojo de la segunda derivada en la región amida I de muestras de suero líquido polivalente. a) control sin pasteurizar y b) pasteurizado con sorbitol 2.0 M.

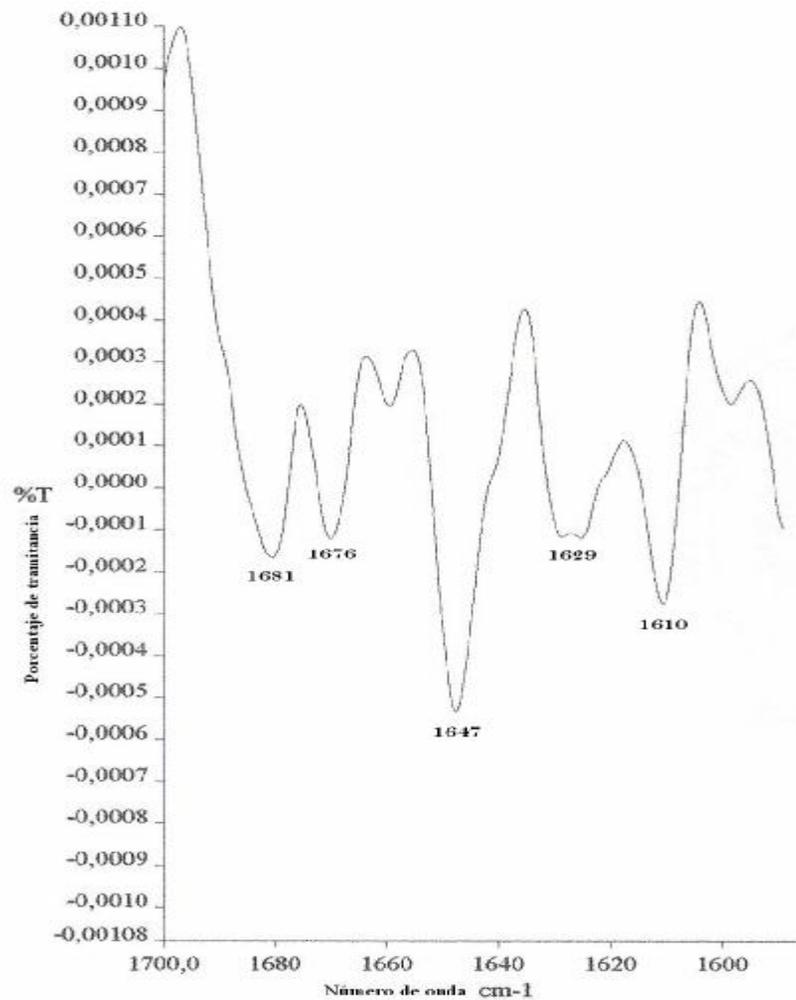


Fig. 20. Espectro infrarrojo de la segunda derivada en la región amida I de una muestra control de suero líquido polivalente pasteurizada.

## **DISCUSION DE RESULTADOS**



### **ENSAYO DE PASTEURIZACION**

La Organización Mundial de Salud (WHO) recomienda el uso de la pasteurización (60 °C por 10 horas para formas líquidas), como uno de los métodos más apropiados de inactivación viral para productos derivados de plasma (González *et al.*, 1995; Theakston *et al.*, 2003). De manera complementaria, una gran cantidad de investigaciones a nivel mundial corroboran la efectividad y aplicación de dicho procedimiento, por lo que podemos citar los trabajos de Burnouf *et al.* (2004), Chandra *et al.* (2002) y Sisti *et al.* (2001), a partir de los cuales se deriva la elección de la metodología seguida en la presente investigación.

La seguridad viral de un producto de administración intravenosa como el suero antiofídico, resulta de gran preocupación para las autoridades por cuanto el material de partida proviene de un animal doméstico como el caballo y se sabe que un amplio rango de infecciones virales en humanos han sido originadas en animales, incluyendo el HIV (Lebing *et al.*, 2003).

En relación con este último punto, es importante aclarar que el suero antiofídico producido por el ICP cumple con los estándares de seguridad establecidos por los organismos internacionales, de manera que las pruebas de control de calidad han demostrado que mediante los pasos de precipitación con ácido caprílico y la filtración con membranas de 0.22 micrómetros, así como el monitoreo estricto de la salud de los caballos, se asegura un control eficaz de posibles patógenos para los humanos como bacterias, hongos y virus. No obstante, para incorporar un paso que refuerce la seguridad viral del producto, en este caso la pasteurización, se requeriría de estrategias de protección de las inmunoglobulinas, puesto que ensayos anteriores a esta investigación, han demostrado que no es posible aplicar dicho procedimiento, bajos las condiciones actuales del suero.

Así mismo, para efectos de este trabajo, el procedimiento de pasteurización se consideró como un método eficaz para estudiar el efecto de uno de los mayores agentes desnaturalizantes (temperaturas elevadas), sobre las inmunoglobulinas, así como el desempeño de los osmolitos en la protección térmica de las mismas.

## **ELECCION Y APLICACION DE LOS OSMOLITOS**

Debido a que en la pasteurización se aplican temperaturas elevadas, se torna indispensable el uso de estabilizantes para proteger la función de las proteínas del plasma, así como evitar alteraciones a nivel molecular (Chandra *et al.*, 2002; Lai y Topp, 1999), siendo la selección de éstos dependiente del tipo de compuesto, concentración o cantidad y actividad funcional (Burnouf y Radosevich, 2000).

De manera reiterada, se ha documentado en la literatura el comportamiento de un grupo de compuestos, tales como azúcares, polioles, sales y algunos aminoácidos, de inducir una fuerte hidratación preferencial de proteínas nativas, sea porque aumentan la tensión superficial del agua o porque aumentan la solvofobicidad, de forma tal que, universalmente, estabilizan proteínas globulares contra este tipo de condiciones desfavorables (Arakawa *et al.*, 2001; Bhat y Timasheff, 1992; Timasheff, 2002; Xie y Timasheff, 1997).

Para el proceso de escogencia de los agentes estabilizantes apropiados, se llevó a cabo una extensa revisión bibliográfica para determinar cuáles agentes utilizar y en qué cantidades. De esta manera, surgió la elección del sorbitol, el manitol y la glicina, siendo los dos primeros polioles (“azúcares de alcohol”) y el último un aminoácido. De los tres osmolitos, el sorbitol se cita con mayor frecuencia en los ensayos de estabilidad térmica de inmunoglobulinas, planteándose como uno de los estabilizantes más utilizados y efectivos. En este sentido, podemos citar las investigaciones de Al-Abdulla *et al.* (2003), González *et al.* (1995), Rodríguez *et al.* (1999), Sisti *et al.* (2001) y Wang (1999), de los que se desprende el rango de 0.5 a 1.0 M como la concentración más apropiada para obtener resultados significativos.

A pesar de que el manitol se presenta menos eficaz en varios ensayos frente al sorbitol, también se presentan algunos casos donde ocurre lo contrario o bien, no se encuentra una diferencia significativa entre ambos. De acuerdo con los trabajos de Burnouf y Radosevich (2000), Sharma y Kalonia (2004) y Wang (1999) se deriva la utilización de dicho osmolito en una concentración dentro del rango de 0.3 hasta 1.8 M.

Por último, el tercer osmolito seleccionado fue la glicina, un aminoácido que de acuerdo con los trabajos de Parthasarathy y Murthy (2000) y Wang (1999)

podría ser una alternativa viable para cumplir con los propósitos de este trabajo, en el amplio rango de concentración que va desde 180 mM hasta 2 M. Al igual que en el suero, se siguió el mismo esquema de estabilización para el plasma, empleando los tres osmolitos elegidos, de manera que el estabilizante se pueda adicionar desde un inicio en el esquema de producción de los sueros, ejerciendo su efecto protector en el transcurso del proceso.

Cuando se emplean osmolitos para productos terapéuticos como los utilizados, es necesario aplicar ciertos criterios que restrinjan su utilización. En concordancia con esta afirmación, los compuestos seleccionados para este ensayo son seguros, no tóxicos, no infecciosos y no se reporta ningún tipo de reacción adversa en pacientes (Arakawa *et al.*, 2001; Theakston *et al.*, 2003; Wang, 1999). Así mismo, se estipula que la solución debe ser isotónica con respecto a la ruta y al modo de administración (Theakston *et al.*, 2003), condición que también se cumple, gracias a las bajas concentraciones empleadas. Resulta importante destacar que la Organización Mundial de la Salud, aprueba el uso de dichos osmolitos para prolongar la estabilidad y la caducidad de formulados de aplicación farmacológica (Booy *et al.*, 1992; Theakston *et al.*, 2003).

Sin embargo, de acuerdo con lo establecido por la WHO, toda solución de IgG de administración intravenosa debe contener como máximo un 10% de osmolitos y otros compuestos (González *et al.*, 1995). En adición a lo anterior, Wang (1999) recomienda, que de utilizarse azúcares como agentes estabilizantes, se debe mantener su concentración al mínimo, debido a que pueden interactuar con los grupos amino de las proteínas de manera poco clara hasta el momento. Por tanto, es vital lograr dilucidar los niveles mínimos en los que estos aditivos presentan una actividad estabilizante significativa; de ahí se desprenden las concentraciones elegidas.

Por otro lado, la elección de la concentración adecuada de osmolito no solo se limita a los posibles efectos, positivos o negativos sobre las inmunoglobulinas, sino que entra en juego otro factor importante como lo es la solubilidad (Cuadro 11). Por consiguiente, dicha característica también fue tomada en cuenta en el momento de elegir las cantidades a utilizar y constituye la principal causa explicativa de que en el primer ensayo con manitol, éste no se pudiera disolver adecuadamente para la concentración de 1 M, puesto que dicha concentración es superior a su límite de solubilidad en

agua a 25°C (The Merck Index, 2001). Siguiendo este mismo análisis, para el caso de la solución de suero con glicina, probablemente, la formación de los cristales se debió a que al bajar la temperatura también disminuye la solubilidad (Chang, 1999), por lo que las estructuras observadas corresponden a trazas de glicina no soluble, razón suficiente para descartar la aplicación de este osmolito.

Cuadro 10. Solubilidad en agua de los osmolitos utilizados.

<b>Compuesto</b>	<b>Solubilidad</b>
Sorbitol	83 g /100 ml
Manitol	18 g / 100 ml
Glicina	25 g / 100 ml

Fuente: The Merck Index (2001).

En última instancia, concentraciones muy altas del osmolito más bien podrían causar desnaturalización de las inmunoglobulinas (Manning *et al.* 1989), fenómeno que podría darse paralelamente a la estabilización (Shimizu y Chan, 2001). Debido a esto, adquiere gran importancia aplicar la cantidad mínima del compuesto que alcance el efecto de estabilización requerido.

## **TURBIDEZ**

La turbidez o “nubosidad” en un líquido, puede interpretarse como la ausencia de claridad o brillantez, y es causada por materia coloidal suspendida u organismos microscópicos (Chang, 1999). En este sentido, finalizado el ensayo de pasteurización, se registraron importantes diferencias visuales en cuanto a la turbidez y el estado físico de las muestras, tanto para los diferentes osmolitos como la concentración de cada uno de ellos, en dependencia del tiempo de muestreo.

Como se observa en las fotografías de las figuras 4, 5 y 7 , para el tiempo final del experimento, aún con la concentración más alta de osmolito, no se pudo evitar la aparición de turbidez, pero por sí sola, esta observación no es razón suficiente para afirmar que haya desnaturalización de inmunoglobulinas, tal como lo afirman Cádiz *et al.* (1999) y González *et al.* (1995). Sin embargo, en el caso del plasma, al aplicar la pasteurización, el cambio en apariencia es extensivo, pues no solamente se produce turbidez, ya que además hay un cambio de color y de consistencia, indicativos de un cambio más profundo en las estructuras componentes originales.

Como observación adicional, se puede apuntar que, después de centrifugar las diferentes muestras para el caso del ensayo con suero líquido polivalente, se obtuvieron resultados variables entre cada osmolito y nivel de concentración. Destaca el hecho de que para las concentraciones más altas de manitol y sorbitol no se dio la formación de sedimento, lo cual podría ser indicativo de un bajo nivel de agregación, puesto que los componentes de la muestra se mantuvieron en solución, mediado por un mantenimiento de su estructura nativa (Mathews *et al.*, 2002). Lo anterior en términos de agregados insolubles, puesto que no se puede descartar la presencia de agregados solubles, parámetro que se analizó a partir de la cromatografía líquida para proteínas (FPLC).

Con base en estos resultados, se podría pensar que en condiciones normales (control) las inmunoglobulinas u otras proteínas del suero, empiezan a desnaturalizarse y agregarse a partir de las 6 horas de calentamiento, que es el punto en el que se forma un sedimento consecuencia de la centrifugación, como queda latente para las muestras control, sorbitol y manitol a 0.2 M y glicina a 0.2 y 0.6 M. En alusión al aminoácido, el patrón parece ser el mismo, en el sentido de que con la concentración más alta de éste (1.0 M), no se obtuvo ningún sedimento posterior a la centrifugación, lo cual como se mencionó antes, puede ser un indicativo del mantenimiento de las proteínas en solución.

Por su parte, siguiendo este mismo análisis, para las muestras de plasma, los resultados de la centrifugación fueron más evidentes, como quedó latente al centrifugar la muestra control después del calentamiento, en donde prácticamente toda la solución sedimentó. Las muestras con sorbitol y manitol, presentaban sedimentos para todos sus niveles de concentración, los cuales eran mayores que cualquiera de los observados para el ensayo con suero líquido, lo cual representa un indicativo de una mayor cantidad de proteínas u otros compuestos precipitados, en concordancia con las características típicas del plasma, el cual no ha recibido todo el proceso de purificación y tratamiento como sí lo posee el suero líquido. Por el contrario, las muestras con glicina prácticamente no mostraron sedimento alguno, en especial la que contenía la concentración más alta del osmolito (2.0 M), aunque como se menciona luego, esto no puede ser visto como un indicativo confiable de la efectividad estabilizante del agente, cuyo comportamiento es totalmente opuesto en las muestras para suero líquido.

El suero antiofidico producido en el ICP contiene, además de las inmunoglobulinas, pequeñas cantidades de otras proteínas séricas, como albúmina, alfa-globulinas y beta-globulinas (Lebing *et al.*, 2003). De acuerdo con lo planteado por Moya *et al.* (2000), además de su gran solubilidad, la albúmina es una proteína notablemente estable a temperaturas de hasta 70 °C. De acuerdo con esta información, podría suponerse que la albúmina no estaría contribuyendo de manera destacable en la turbidez provocada por la pasteurización.

Por otro lado, la cantidad de anticuerpos desnaturalizados que causan la turbidez deberá ser muy pequeña, en vista de que a partir de las pruebas de ELISA se desprende la afirmación del mantenimiento del título de anticuerpos. En adición, dado que la turbidez es provocada por compuestos insolubles, los datos de turbidimetría demuestran que el sorbitol se disuelve de manera adecuada en el suero, así mismo, se evidencia el efecto protector de éste al mantener en un nivel bajo (comparado con el control) la turbidez de la solución.

Un análisis específico de las causas de turbidez en antivenenos producidos por el ICP fue llevado a cabo por Rojas *et al.* (1993). En dicho trabajo, se sugiere que la turbidez aparece como resultado de la interacción de al menos tres factores: 1) congelamiento o almacenamiento a 4 °C por períodos prolongados; 2) altas concentraciones de lipoproteínas, colesterol y triglicéridos en el suero fraccionado; y 3) la inclusión de fenol durante el fraccionamiento del plasma, siendo este último factor posiblemente el más importante (también corroborado por Rodríguez *et al.*, 1999, con sueros producidos en Brasil). Por tanto, a partir de esta última evidencia, podríamos pensar que la turbidez se estaría dando en forma mayoritaria, por compuestos lipídicos de los equinos, en vista de que en todo momento se contó con las condiciones adecuadas de almacenamiento, además, en el caso del ICP el plasma no contiene fenol.

Aunque se desconozca su identidad, no se podría afirmar que las partículas causantes de esta turbidez puedan resultar perjudiciales para la salud humana, pero en todos los casos, se considera como una característica indeseable (Theakston *et al.*, 2003). A raíz de lo anterior, representa un factor a corregir a futuro, aunque se demuestre que el nivel de anticuerpos se mantenga inalterado, así como la capacidad neutralizante del suero. No

obstante, están documentados casos particulares en los que aplicando sorbitol como estabilizante si se logró impedir la formación de turbidez, aún después de la pasteurización (Sisti *et al.*, 2001), por lo que no debería descartarse del todo la utilidad del osmolito.

#### **CANTIDAD DE PROTEINA TOTAL EN SOLUCION**

Los resultados obtenidos de la determinación de proteína total (Cuadros 7 y 8), demuestran que la incorporación de los diferentes estabilizantes no altera el nivel proteico inicial de las muestras al momento de su adición, lo cual es una evidencia valiosa en cuanto a la implementación de este tipo de compuestos. Más relevante aún, en el suero líquido polivalente se comprueba un mantenimiento de la cantidad de proteína total después del proceso de pasteurización, en contraposición del suero control, con una disminución de poco más del 50% de la proteína total presente al inicio (después de centrifugar las muestras). Lógicamente, si se mantiene este parámetro, se están conservando las proteínas más importantes que son los anticuerpos.

En el caso del plasma polivalente, los resultados no fueron tan satisfactorios, pues aún con osmolitos, se dio una pérdida importante de proteína, la cual debería incluir anticuerpos, por los resultados deficientes en la prueba de ELISA (siguiente sección).

#### **TITULO DE ANTICUERPOS**

En relación con el primer ensayo de pasteurización para suero líquido, se determinó que la concentración más alta de cada osmolito fue la más eficiente en cuanto al mantenimiento del título de anticuerpos, lo cual se correlaciona con el de los niveles de proteína total detectados con anterioridad. De los tres aditivos, el sorbitol fue el que retuvo mayor cantidad de anticuerpos después de la pasteurización. Sin embargo, incluso en este caso, se dio una pérdida de absorbancia (alrededor del 14%), lo cual gracias a la prueba de ELISA se puede estipular como una pérdida de anticuerpos, aunque en mucho menor medida que el suero sin osmolitos, que tuvo una pérdida en la absorbancia del 40%.

A partir de esta prueba, se denota el efecto protector de un osmolito como el sorbitol en comparación con el control. Así mismo, al emplear

concentraciones más altas de este aditivo en el segundo ensayo de pasteurización con suero líquido, se logró obtener una absorbancia igual a la del control sin pasteurizar, lo cual puede implicarse con un mantenimiento de la totalidad de las inmunoglobulinas. Esto no implica que no hayan sufrido del todo ningún proceso de desnaturalización durante la pasteurización, pero de haber ocurrido, tendría que ser un efecto muy leve puesto que los anticuerpos conservan su capacidad de reconocer y adherirse a los determinantes antigénicos de las toxinas del veneno. Debido a los resultados contundentes con el sorbitol en concentraciones mayores a 1.0 M, el resto de pruebas de análisis realizadas se centraron en estas muestras, puesto que con los otros osmolitos se pierde una cantidad importante del componente de interés, aunado al hecho de que no se pueden adicionar en concentraciones mayores por problemas de solubilidad.

Para el caso del plasma, los resultados no fueron satisfactorios, puesto que en todos los casos se da una disminución de la absorbancia, lo cual se puede relacionar con una pérdida importante de anticuerpos. De forma llamativa, en este ensayo, el sorbitol resultó ser el menos eficiente en el mantenimiento del título de anticuerpos, aunque el manitol, que presentó la mayor absorbancia, registró una pérdida de alrededor del 40% de absorbancia.

#### FORMACION DE AGREGADOS

Para analizar los factores que influyen en la estabilidad de las proteínas durante el almacenamiento, son indispensables métodos que permitan reconocer cambios en diferentes períodos de tiempo. En la actualidad, la mayoría de técnicas que se utilizan se enfocan en caracterizar las propiedades electroforéticas y cromatográficas de las proteínas. Al respecto, más que medir cambios o la desaparición de componentes, lo que se recomienda es detectar la aparición de nuevas especies, en regiones donde anteriormente no se detectaba nada (Arakawa *et al.*, 2001). Por tanto, para monitorear la formación de agregados se recurrió a la electroforesis en geles de poliacrilamida y la cromatografía líquida de proteínas, siguiendo la recomendación mencionada antes.

En cuanto a la electroforesis, se sabe que la migración electroforética es inversamente proporcional al tamaño de las proteínas (Mathews *et al.*, 2002), por lo que en nuestro caso, permitiría visualizar la formación de agregados

por el aumento en el peso molecular de las estructuras presentes. Sin embargo, a pesar de la gran utilidad de esta técnica en el panorama actual, para efectos del presente trabajo, no representa una prueba contundente para establecer algún criterio respecto a la efectividad de uno u otro osmolito. Se debe destacar que al no haber diferencias de importancia en el patrón de bandas entre las muestras control a las 0 horas y las muestras con los diferentes osmolitos a las 10 horas, en apariencia, no hay modificación electroforética, ni ausencia de bandas o aparición de otros fragmentos, indicando que la composición de la solución se mantiene después del calentamiento. Estos resultados son extendidos para todos los ensayos de pasteurización realizados, razón por la que resultaba redundante incluir más fotografías en la sección de resultados.

En el caso del plasma, el nivel de agregación resultó ser tan elevado que al introducir las muestras en el gel solo se observaba una gran mancha al inicio de los pozos del gel, que debido a su alto peso molecular no podía migrar al aplicar el campo eléctrico. Por tanto, se decidió montar los sobrenadantes de las muestras centrifugadas, en cuyo caso se observó un patrón electroforético muy tenue, posiblemente porque la mayoría de componentes se encontraban en el residuo resultado de la centrifugación. Por consiguiente, se decidió aplicar los residuos resuspendidos en solución salina (PBS), en cuyo caso si se obtuvo migración electroforética pero, al igual que en el suero líquido, no se evidenciaron diferencias importantes entre los diferentes osmolitos y sus respectivas concentraciones; al compararlos con el control sin pasteurizar, la única diferencia en apariencia fue una menor intensidad de las bandas en las muestras pasteurizadas.

Con base en estos resultados, en combinación con la pérdida en la cantidad de proteína total, la disminución en el título de anticuerpos y los altos niveles de turbidez y agregación, se descartó la implementación de osmolitos como estabilizantes térmicos en el plasma. Posiblemente, debido a que en esta solución se encuentran inmersos una gran cantidad de componentes además de las inmunoglobulinas, como hormonas, factores de coagulación, lipoproteínas, iones metálicos y otros compuestos no celulares, fue más complicado para los osmolitos ejercer su acción sobre los anticuerpos. Por ese motivo, se decidió no realizar más pruebas de análisis en este sentido.

Como se mencionó con anterioridad, la otra prueba para el monitoreo de la agregación fue la del FPLC. Esta técnica se basa en el principio de exclusión por tamaño, por lo que es un método que permite separar diferentes proteínas con base en su tamaño molecular (Nelson y Cox, 2000).

Con base en los resultados de este análisis, se demuestra que con la adición de osmolitos, durante la pasteurización se produce un nivel muy bajo de agregación, puesto que para las diferentes concentraciones de sorbitol éste parámetro aumentó como máximo en 1.22%, en comparación con el porcentaje de agregación del suero control sin pasteurizar que es muy similar al reportado con anterioridad para lotes de suero antiofídico producidos por el ICP (León *et al.*, 2005).

A propósito de este factor, es importante mencionar que el nivel de agregación debe ser determinado por el propio fabricante, aunque a manera de comparación, en sueros antiofídicos producidos en otros países, se pueden encontrar niveles de agregación cercanos al 6% (Cádiz *et al.*, 1999), por lo que en nuestro caso podríamos hablar de una agregación muy baja. Adicionalmente, en ensayos realizados por León *et al.* (2005), al calentar una preparación de inmunoglobulinas producidas por el ICP, durante 90 minutos a 60 °C en un baño de agua, se reportó un 6.8% de agregación, lo cual refuerza la aseveración de la efectividad del sorbitol, puesto que en el presente trabajo se sometió a dicha temperatura durante 10 horas.

Se debe resaltar que no fue posible estimar el nivel de agregación del suero pasteurizado sin sorbitol, por cuanto al introducir la muestra al sistema, se registró un único pico extremadamente pequeño. Al respecto, durante la filtración de la muestra con una membrana de 0.22 micrómetros, fue un tanto complicado lograr circular la muestra por el filtro. Por consiguiente, podría suponerse que el nivel de agregados era tan alto que la mayoría de componentes de la muestra quedaron atrapados en el filtro.

En un producto farmacéutico de esta naturaleza, se le debe brindar especial atención a la formación de agregados, por cuanto, aunque la terapia con preparaciones intravenosas de inmunoglobulinas ha sido empleada efectivamente en una gran variedad de condiciones (Kroez *et al.*, 2003), se ha asociado la presencia de agregados con la aparición de reacciones adversas tempranas (EAR) de variable incidencia para diferentes productos (Rojas *et*

*al.*, 1990; León *et al.*, 2005; Theakston *et al.*, 2003). Así mismo, los agregados de proteínas pueden tener actividad reducida o nula, reducida solubilidad, inmunogenicidad alterada (Mathews *et al.*, 2002; Wang, 1999), y por lo general, es un fenómeno irreversible, razones suficientes para considerar inaceptable un producto farmacéutico de esta índole (Theakston *et al.*, 2003; Wang, 1999).

De acuerdo con la literatura consultada, a temperaturas elevadas, donde están presentes una cantidad relativamente alta de moléculas de IgG parcialmente desdobladas, la tasa de agregación ocurre tan rápido que las moléculas de IgG se entrelazan en agregados antes de que sean completamente desnaturalizadas (Veermer y Norde, 2000). Debido a que la agregación está aumentando de manera ligera con respecto al suero sin pasteurizar, es posible que ésta sea la razón explicativa por la que se visualiza turbidez en las muestras pasteurizadas, a pesar de que el título de anticuerpos se mantenga constante (Theakston *et al.*, 2003). Por lo tanto, podríamos estar hablando de ligeras asociaciones entre anticuerpos, no mayores a dímeros, que aunque puedan conservar su especificidad de acción, es un factor que debe abordarse con más detenimiento, evidenciándose la importancia de los métodos de producción de antiveneno que se empleen.

#### ESTRUCTURA SECUNDARIA PROTEICA

La espectrofotometría de infrarrojo es una de las técnicas más eficaces para identificar compuestos orgánicos e inorgánicos puros, porque con la excepción de unas pocas moléculas homonucleares, todas las especies moleculares absorben radiación infrarroja (Skoog *et al.*, 1997). Además, cada especie molecular presenta un único espectro de absorción, por lo tanto, dicho carácter irreplicable permite la identificación inequívoca de la muestra analizada (Susi *et al.*, 1967).

Para efectos de una investigación como la presente, esta técnica resulta muy informativa, porque puede ser empleada para estudiar la estructura secundaria de las proteínas en cualquier estado, sea en forma acuosa, congelada, seca o hasta como un precipitado insoluble (Carpenter *et al.*, 1998; Skoog *et al.*, 1997). Dicha información se obtiene a través del análisis de la región amida I, la cual se localiza entre los 1600 y 1700  $\text{cm}^{-1}$  (número de onda). Se dice que esta banda es, en términos de conformación, sensible a

modificaciones de la estructura de la proteína, debido a vibraciones provocadas por el estiramiento en el plano de enlaces C=O, asociado débilmente con vibraciones producto del estiramiento de enlaces C-N y el doblamiento de enlaces N-H (Andya *et al.*, 2003; Carpenter *et al.*, 1998; Susi *et al.*, 1967). Los diversos tipos de estructura secundaria (hélice- $\alpha$ , lámina- $\beta$ , giro- $\beta$ , entre otras), dan origen a diferentes frecuencias de estiramiento de los enlaces C=O, y por ende, resultan en señales muy características, las cuales son designadas con un número de onda. Dichas posiciones de banda son utilizadas para determinar los tipos de estructura secundaria presentes en una proteína. Así mismo, el área relativa de estas bandas puede utilizarse para cuantificar la cantidad de cada componente estructural (Andya *et al.*, 2003; Carpenter *et al.*, 1998).

El efecto protector de los osmolitos en la conformación de la proteína, puede evaluarse con base en la magnitud del cambio de la estructura secundaria (Souillac *et al.*, 2002; Susi *et al.*, 1967; Veermer y Norde, 2000), puesto que el daño producido por las altas temperaturas se relaciona con cambios en los patrones de plegamiento y conformación tridimensional de la proteína (Carpenter *et al.*, 1998). A partir de este análisis, se puede observar que el espectro de la segunda derivada, obtenido de la solución no protegida por osmolitos durante la pasteurización, se presenta altamente alterado, en comparación con el espectro de la forma sin pasteurizar, lo cual implica un cambio drástico en la composición de estructuras secundarias. Por su parte, en el caso de las muestras pasteurizadas con sorbitol, se pueden identificar las mismas estructuras presentes en el control con una leve variación de uno o dos números de onda, lo cual implica un mantenimiento de la composición de estructuras secundarias presentes.

La molécula de IgG consiste de diferentes elementos estructurales (dominios), predominando las láminas- $\beta$  (45-47%) hélices- $\alpha$  (2-7%) y en menor medida giros- $\beta$  (Relkin *et al.*, 2000; Souillac *et al.*, 2002). El resto corresponde a lo que se conoce como giros desordenados (Maury *et al.*, 2004). Por lo tanto, en las muestras pasteurizadas con sorbitol, se puede establecer que el contenido de láminas- $\beta$  es muy similar al presentado en la estructura nativa (predominante), en proporción con el porcentaje de giros desordenados detectados para esta proteína. Esto sugiere que el osmolito es eficiente en minimizar los cambios en la estructura secundaria, provocados por un factor desnaturizante como las temperaturas elevadas.

Resulta destacable señalar que la estructura tridimensional de una proteína, y en especial la estructura secundaria, determinan en gran medida su actividad biológica (Mathews *et al.*, 2002). De manera extendida, a nivel mundial se han reportado alteraciones en la composición de estructura secundaria de soluciones de inmunoglobulinas, causadas principalmente por procedimientos como la liofilización o el almacenamiento, lo cual se traduce en pérdida de actividad (Maury *et al.*, 2004; Theakston, 2003). Por consiguiente, si el sorbitol favorece el mantenimiento de dicha estructura durante la pasteurización, podría suponerse que dicho efecto también podría extenderse a otro tipo de condiciones. Por tanto, se destaca la trascendencia de evitar la pérdida de la capacidad neutralizante de los sueros antiofídicos, por efecto de cambios en la conformación tridimensional de las inmunoglobulinas.

Por último, aunque la turbidez se destaca como una característica indeseable para productos de este tipo, a partir de los resultados de la espectrofotometría de infrarrojo, se puede apuntar que el nivel de agregación de las muestras pasteurizadas con sorbitol no implica una alteración en la conformación tridimensional de las inmunoglobulinas.

#### ESTABILIDAD A LARGO PLAZO

La estabilidad a largo plazo de la actividad neutralizante del suero producido por el ICP, ha sido demostrada en numerosos ensayos (Gené *et al.*, 1986; Gutiérrez *et al.*, 1988, Rojas *et al.*, 1990) siempre que se mantengan las condiciones de refrigeración y almacenamiento requeridas (principalmente para el caso del suero líquido). Sin embargo, se produce un deterioro en la actividad neutralizante del suero después de seis meses a un año, cuando se mantiene a temperaturas cercanas a los 30 °C (Gené *et al.*, 1986), lo cual se torna sumamente relevante en países del trópico con temperaturas muy altas en ciertas épocas del año, o en países donde no se cuentan con las condiciones de almacenamiento, como sucede muy a menudo en África.

Como un aspecto complementario a lo anterior, en la publicación de Rojas *et al.* (1990), se revela que muestras de suero almacenadas a temperaturas de 23, 30 y 37 °C, después de nueve, cuatro y tres meses respectivamente, presentaban un incremento moderado en la turbidez. Análisis

cromatográficos y electroforéticos demostraron que dicha turbidez era provocada por la formación de agregados proteicos heterogéneos de alto peso molecular.

En dicho contexto, aunque en la presente investigación no se desarrollaron pruebas con los osmolitos bajo estas condiciones, podría suponerse que si las muestras de suero pasteurizadas se mantuvieron relativamente poco alteradas respecto al control, con la simple adición del sorbitol, en condiciones desnaturalizantes de menor intensidad como las mencionadas, podrían obtenerse resultados muy positivos en dicho sentido, tal como se evidencia en las publicaciones de Arakawa *et al.* (2001), Chang *et al.* (2005a) y Chang *et al.* (2005b).

A razón de favorecer la conservación del producto, de manera generalizada se ha recurrido a la liofilización como alternativa de almacenamiento a largo plazo. No obstante, dificultades para redissolver los antivenenos liofilizados han sido reportadas, lo cual puede reflejar desnaturalización del producto; así mismo, están involucrados altos costos de producción y potenciales alteraciones fisicoquímicas durante la liofilización (Theakston *et al.*, 2003).

Por consiguiente, si la adición de un osmolito favorece la conservación de las inmunoglobulinas cuando no se disponen de adecuados sistemas de refrigeración para su distribución y almacenamiento, se podría preferir la preparación de antivenenos en forma líquida, con menores costos de producción y en mayor beneficio de los que lo necesiten.

## **CONCLUSIONES**

---



A partir de todos los ensayos y observaciones realizadas en el desarrollo de la presente investigación, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- ✓ La estrategia de estabilización mediada por osmolitos no resulta eficiente si se aplica al plasma, ya que el título de anticuerpos y en general el contenido proteico total, disminuyen considerablemente con la pasteurización.
- ✓ El sorbitol como estabilizante en la pasteurización de suero líquido polivalente, es efectivo en el mantenimiento del título de anticuerpos, la preservación de la estructura secundaria de las IgG, la conservación de un nivel bajo de agregación y en general, mejora la apariencia visual del producto.
- ✓ La concentración de sorbitol más efectiva para la estabilización térmica de inmunoglobulinas se ubica entre 1 y 2 M.
- ✓ La glicina y el manitol no se consideran como estabilizantes apropiados para proteger las inmunoglobulinas de la desestabilización térmica. Así mismo, el aminoácido presenta problemas de solubilidad a temperaturas bajas de refrigeración.
- ✓ En términos generales, en cualquier situación en que se desee implementar el manitol como osmolito en suero antiofídico, su concentración no debe superar los 0.8 M (por problemas de solubilidad), pero deber ser mayor a 0.2 M para que presente un efecto significativo.
- ✓ A partir de la literatura consultada, no se recomienda el uso de la sacarosa como estabilizante de suero antiofídico, por su posible implicación en el deterioro de las funciones renales del paciente (Theakston *et al.*, 2003).
- ✓ En términos generales, ninguno de los osmolitos empleados previene la aparición de turbidez, fenómeno que debe abordarse con algún tipo de estrategia adicional.

## **RECOMENDACIONES**



Es importante tomar en consideración que las diferencias estructurales entre diferentes proteínas y las variaciones en el proceso de producción son tan significativas que no se puede establecer una estrategia de estabilización térmica universal. A pesar de estas particularidades, se puede recomendar el uso de los osmolitos aquí presentados para la estabilización térmica de cualquier otro producto proteico, siempre que se realicen los ensayos específicos para cada caso.

Por otro lado, resulta apropiado destacar que gracias a la revisión bibliográfica, se desprende que en la actualidad, la trehalosa es el agente más eficiente para la estabilización térmica de soluciones de proteínas para productos farmacéuticos, como es señalado en los trabajos de Kaushik y Bhat (2003) y Sola y Meyer (1998). A pesar de que ésta no se consideró como una alternativa viable debido a su alto costo y disponibilidad, resulta válido tenerlo en cuenta para futuros proyectos en el área.

De manera concreta, en el caso del Programa de Sueros Antiofídicos del Instituto Clodomiro Picado, si se desea darle seguimiento a la presente investigación, se recomienda la realización de pruebas *in-vivo*, que por razones de tiempo no pudieron implementarse, y que podrían dar información definitiva sobre la utilización de los osmolitos presentados. Así mismo, podría establecerse un estudio específico de la efectividad de la pasteurización en la inactivación de virus en el plasma, de manera que podrían plantearse algunas variaciones en su procedimiento (sea la temperatura o el tiempo de exposición), en cuyo caso los osmolitos utilizados podrían desempeñarse en forma más eficaz.

De mayor relevancia resulta la experimentación de osmolitos como el sorbitol como preservante, para estabilizar el suero antiofídico líquido durante su almacenamiento, especialmente en aquellos lugares donde no se pueden suministrar las condiciones pertinentes para tal fin.

Por último, en el caso de que se deseen emplear osmolitos en suero antiofídico liofilizado, se recomienda la combinación de sorbitol y manitol, puesto que el primero funciona como estabilizante (crioprotector), pero no como mejorador de la estructura física del producto terminado, como si lo hace el manitol, por lo que una combinación de los dos compuestos sería idónea (Cicerone *et al.*, 2005; Taylor y Zografí, 1998; Theakston *et al.*, 2003).

## **BIBLIOGRAFIA**

---



- AL-ABDULLA, I.; GARNVWA, J.; RAWAT, S.; SMITH, D.; LANDON, J.; NASIDI, A. 2003. Formulation of a liquid ovine Fab-based antivenom for the treatment of envenomation by the nigerian carpet viper (*Echis ocellatus*). *Toxicon*. 42(4): 399-404.
- ALLISON, S.; CHANG, B.; RANDOLPH, T.; CARPENTER, J. 1999. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 365(2): 289-298.
- ANDYA, J.; HSU, C.; SHIRE, S. 2004. Mechanisms of aggregate formation and carbohydrate excipient stabilization of lyophilized humanized monoclonal antibody formulations. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*. 5(2): artículo 10.
- ARAKAWA, T.; KITA, Y.; CARPENTER, J. 1991. Protein-solvent interactions in pharmaceutical formulations. *Pharmaceutical Research*. 8(3): 285-291.
- ARAKAWA, T.; PRESTRELSKI, S.; KENNEY, W.; CARPENTER, J. 2001. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 46(3): 307-326.
- BHAT, R.; TIMASHEFF, S. 1992. Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols. *Protein Science*. 1(9): 1133-1143.
- BOOY, M.; RUITER, R.; MEERE, A. 1992. Evaluation of the physical stability of freeze-dried sucrose-containing formulation by differential scanning calorimetry. *Pharmaceutical Research*. 9(1): 109-114.
- BURNOUF, T.; RADOSEVICH, M. 2000. Reducing the risk of infection from plasma products: Specific preventative strategies. *Blood Reviews*. 14(2): 94-110.

- BURNOUF, T.; GRIFFITHS, E.; PADILLA, A.; SEDDIK, S.; STEPHANO, M.; GUTIERREZ, J. 2004. Assessment of the viral safety of antivenoms fractionated from equine plasma. *Biologicals*. 32(3): 115-128.
- CADIZ, A.; HERNANDEZ, J.; JOO, L.; MOYA, A.; CAMERO, A. 1999. Pasteurización de soluciones de inmunoglobulinas de uso intravenoso: Uso de azúcares como estabilizantes. *Revista Cubana de Farmacia*. 33(2): 83-88.
- CARNINCI, P.; NISHIYAMA, Y.; WESTOVER, A.; ITOH, M.; NAGAOKA, S.; SASAKI, N.; OKASAKI, Y.; MURAMATSU, M.; HAYASHIZAKI, Y. 1998. Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. 95(2): 520-524.
- CARPENTER, J.; PRESTRELSKI, S.; DONG A. 1998. Application of infrared spectroscopy to development of stable lyophilized protein formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 45(3): 231-238.
- CHANDRA, S.; GROENER, A.; FELDMAN, F. 2002. Effectiveness of alternative treatments for reducing potencial viral contaminants from plasma-derived products. *Thrombosis Research*. 105(4): 391-400.
- CHANG, R. 1999. *Química*. Sexta Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. 994 p.
- CHANG, L.; SHEPHERD, D.; SUN, J.; TANG, X.; PIKAL, M. 2005a. Effect of sorbitol and residual moisture on the stability of lyophilized antibodies: Implications for the mechanism of protein stabilization in the solid state. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 94(7): 1445-1455.
- CHANG, L.; SHEPHERD, D.; SUN, J.; OUELLETTE, D.; GRANT, K.; TANG, X.; PIKAL, M. 2005b. Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: Native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix? *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 94(7): 1427-1444.

- CHAVES, F.; AYMERICH, R.; ALVARADO J.; SOLORZANO A. 1996. Aspectos básicos sobre las serpientes de Costa Rica. Oficina de Publicaciones de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 62p.
- CHUANBIN, L.; JIAN, X.; FENGWU, B.; ZHIGUO, S. 1998. Trehalose extraction from *Saccharomyces cerevisiae* after microwave treatment. *Biotechnology Techniques*. 12(12): 941-943.
- CICERONE, M.; SOLES, C.; CHOWDHURI, Z.; PIKAL, M.; CHANG, L. 2005. Fast dynamics as a diagnostic for excipients in preservation of dried proteins. *American Pharmaceutical Review*. 8(22): 1-5.
- GENE, J.; GOMEZ, M.; CERDAS, L. 1986. Estudio sobre la estabilidad de la actividad neutralizante del suero antiofidico contra veneno de terciopelo (*Bothrops asper*). *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*. 7(1): 3-5.
- GONZALEZ, M.; MURATURE, D.; FIDELIO, G. 1995. Thermal stability of human immunoglobulins with sorbitol. *Vox Sanguinis*. 68(1): 1-4.
- GUIAVARC'H, Y.; SILA, D.; DUVETTER, T.; LOEY, A.; HENDRICKX, M. 2003. Influence of sugars and polyols on the thermal stability of purified tomato and cucumber pectinmethylesterases: A basis for TTI development. *Enzyme and Microbial Technology*. 33(5): 544-555.
- GUTIERREZ, J.; LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GENE, J.; CHAVES, F.; ESTRADA, R.; ALVARADO, J.; ROJAS, E.; ROBLES, A. 1988. El suero antiofidico polivalente producido en Costa Rica: Estabilidad y capacidad neutralizante. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*. 9(2): 155-169.
- IMAMURA, K.; OGAWA, T.; SAKIYAMA, T.; NAKANISHI, K. 2002. Effects of types of sugar on the stabilization of protein in the dried state. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 92(2): 266-274.
- JAENICKE, R. 2000. Stability and stabilization of globular proteins in solution. *Journal of Biotechnology*. 79(3): 193-203.

- KAUSHIK, J.; BHAT, R. 2003. Why is trehalose an exceptional protein stabilizer?: An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of compatible osmolyte trehalose. *Journal of Biological Chemistry*. 278(29): 58-65.
- KROEZ, M.; KANZY, E.; GRONSKI, P.; DICKNEITE, G. 2003. Hypotension with intravenous immunoglobulin therapy: Importance of pH and dimer formation. *Biologicals*. 31(6): 277-286.
- LAI, M.; TOPP, E. 1999. Solid-state chemical stability of proteins and peptides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 88(5): 489-500.
- LALLOO, D.; THEAKSTON, R. 2003. Snake antivenoms. *Journal of Toxicology*. 41(3): 277-290.
- LEBING, W.; REMINGTON, K.; SCHREINER, C.; PAUL, H. 2003. Properties of a new intravenous immunoglobulin (IGIV-C, 10%) produced by virus inactivation with caprylate and column chromatography. *Vox Sanguinis*. 84(3): 193-201.
- LEE, J.; TIMASHEFF, S. 1981. The stabilization of proteins by sucrose. *The Journal of Biological Chemistry*. 256(14): 7193-7201.
- LEON, G.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. 2005. Anticomplementary activity of equine whole IgG antivenoms: Comparison of three fractionation protocols. *Toxicon*. 45(1): 123-128.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. 1999. *Biología de los microorganismos*. Octava Edición. Editorial Prentice Hall Iberia. Madrid, España. 1064p.
- MANNING, M.; PATEL, K.; BORCHARDT, R. 1989. Stability of protein pharmaceuticals. *Pharmaceutical Research*. 6(11): 903-918.
- MATHEWS, C.; VAN HOLDE, K.; AHERN, K. 2002. *Bioquímica*. Tercera Edición. Editorial Pearson Educación S.A. Madrid, España. 1368p.

- MAURY, M.; MURPHY, K.; KUMAR, S.; MAUERER, A.; LEE, G. 2004. Spray-drying of proteins: Effects of sorbitol and trehalose on aggregation and FT-IR amide I spectrum of an immunoglobulin G. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 59(2): 251-261.
- MINTON, K.; KARMIN, P.; HAHN, G.; MINTON, A. 1982. Nonspecific stabilization of stress-susceptible proteins by stress-resistant proteins: A model for the biological role of heat shock proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. 79(23): 7107-7111.
- MOYA, A.; PAZ, O.; JOO, L.; GUTIERREZ, E.; RODRIGUEZ, Z.; CADIZ, A. 2000. Estabilización de la albúmina con caprilato de sodio durante su obtención y pasteurización. *VacciMonitor*. 9(4): 10-15.
- NELSON, D; COX, M. 2000. *Principles of Biochemistry*. Tercera Edición. Editorial W.H. Freeman. Estados Unidos. 1100 p.
- O'NEIL, M.; HECKELMAN, P.; KOCH, C.; ROMAN, K.; KENNY, C.; D'ARECCA, M (editores). 2001. *The Merck Index*. Decimo Tercera Edición. Merck Research Laboratories. 2813p.
- PARTHASARATHY, S.; MURTHY, M. 2000. Protein thermal stability: Insights from atomic displacement parameters (*B* values). *Protein Engineering*. 13(1): 9-13.
- PEREIRA, A. 1999. Requirements for protein folding potentials: Perspectives from lattice model simulations. Tesis Dr. Massachusetts, Estados Unidos. Disponible en <[http://www.unb.br/ib/cel/chico/artigos/thesis/no\\_de13.html](http://www.unb.br/ib/cel/chico/artigos/thesis/no_de13.html)> (18/03/06).
- PETERSEN, S.; JONSON, V.; FOJAN, P.; WIMMER, R.; PEDERSEN, S. 2004. Sorbitol prevents the self-aggregation of unfolded lysosyme leading to an up to 13 °C stabilization of the folded form. *Journal of Biotechnology*. 114(3): 269-278.
- PIKAL, M. 2002. Freeze drying. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Universidad de Connecticut, Estados Unidos. p. 1299-1326.

- RELKIN, P.; KAMYSHNY, A.; MAGDASSI, S. 2000. Changes in calorimetric parameters and solvent accessibility of hydrophobic groups in native and chemically modified immunoglobulin G. *Journal of Physical Chemistry*. 104(20): 4980-4985.
- RODRIGUEZ, R.; MARTINS, M.; MAGALHAES, A.; SANTORO, M. 1997. Purification and stability studies of immunoglobulins from *Lachesis muta muta* antivenom. *Toxicon*. 35(8): 1229-1238.
- RODRIGUEZ, R.; ANTUNES, G.; VELARDE, D.; SANTORO, M. 1999. Thermal Stability Studies of Hyperimmune Horse Antivenoms. *Toxicon*. 37(1): 33-45.
- ROJAS, G.; ESPINOZA, M.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. 1990. Effect of storage temperature on the stability of the liquid polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*. 28(1): 101-105.
- ROJAS, G.; VARGAS, M.; ROBLES, A.; GUTIERREZ, J. 1993. Turbidity of hyperimmune equine antivenom: The role of phenol and serum lipoproteins. *Toxicon*. 31(1): 61-66.
- ROJAS, G.; JIMENEZ, J.; GUTIERREZ, J. 1994. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: Description of a rapid procedure for antivenom production. *Toxicon*. 32(3): 351-363.
- ROJAS, G.; GUTIERREZ, J.; AYMERICH, R. 2001. El envenenamiento ofídico en Centroamérica: Fitopatología y tratamiento. Instituto Clodomiro Picado. San José, Costa Rica. 74p.
- ROY, I.; GUPTA, M. 2004. Freeze-drying of proteins: Some emerging concerns. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 39(2): 165-177.
- SANTORO, M.; LIU, Y.; KHAN, S.; HOU, L.; BOLEN, D. 1992. Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochemistry*. 31(23): 5278-5283.

- SHARMA, V.; KALONIA, D. 2004. Effect of vacuum drying on protein-manitol interactions: The physical state of manitol and protein structure in the dried state. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*. 5(1): artículo 10.
- SHIMIZU, S.; CHAN, H. 2001. Statistical mechanics of solvophobic aggregation: Additive and cooperative effects. *Journal of Chemical Physics*. 115(7): 3424-3431.
- SISTI, A.; VITALI, M.; MANFREDI, M.; ZARZUR, J. 2001. Preparation of lyophilized and liquid intravenous immunoglobulin G: Development and scale-up. *Vox Sanguinis*. 80(4): 216-224.
- SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, F. 1997. *Fundamentos de Química Analítica*. Cuarta Edición. Editorial Reverté. Barcelona, España. 885p.
- SOLA, M.; MEYER, J. 1998. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: Why is trehalose more effective than other sugars? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 360(1): 10-14.
- SOLORZANO, A. 2004. *Serpientes de Costa Rica*. Primera Edición. Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), Santo Domingo de Heredia, Costa Rica. 792p.
- SOUILLAC, P.; MIDDAUGH C.; RYTTING, H. 2002. Investigation of protein/carbohydrate interactions in the dried state: Diffuse reflectance FTIR studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 235(2): 207-218.
- SUSI, H.; TIMASHEFF, S.; STEVENS, L. 1967. Infrared spectra and protein conformations in aqueous solutions. *Journal of Biological Chemistry*. 242 (23): 5460-5473.
- TAYLOR, L.; ZOGRAFI, G. 1998. Sugar-polymer hydrogen bond interactions in lyophilized amorphous mixtures. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 87(12): 1615-1621.

- THEAKSTON, R.; WARREL, D.; GRIFFITHS, E. 2003. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*. 41(5): 541-557.**
- TIMASHEFF, S. 2002. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. 99(15): 9721-9726.**
- VERMEER, A.; NORDE, W. 2000. The thermal stability of immunoglobulin: Unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophysical Journal*. 78(1): 394-404.**
- WANG, W. 1999. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*. 185(2): 129-188.**
- XIE, G.; TIMASHEFF, N. 1997. Mechanism of the stabilization of ribonuclease A by sorbitol: Preferential hydration is greater for the denatured than for the native protein. *Protein Science*. 6(1): 211-221.**