

ASPECTOS INMUNOLÓGICOS EN LA PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE ANTITOXINAS * **

Dr. CARLOS LARRALDE, Dr. HECTOR BARBOSA
Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

Dr. JOSÉ LUIS MOLINARI
Instituto de Biología. UNAM

Q.B.P. ROGELIO DEL ARCO
*Laboratorios Dr. Zapata México,
D. F.*

I. Introducción	42
II. Material y métodos	43
1. Efecto de las dosis de antígeno y <i>M. tuberculosis</i> sobre la cinética de producción de antitoxina tetánica	43
2. Efecto de la frecuencia de inmunización y del número de estímulos antigénicos en la cinética de producción de antitoxina tetánica	44
3. Animales	45
4. Antígeno y adyuvante	45
5. Técnica de inmunización y sangrado	45
6. Determinación de unidades de antitoxina (VA)	45
III. Resultados	46
1. Efecto de la dosis de antígeno y <i>M. tuberculosis</i> sobre la cinética de producción de antitoxina tetánica	46

* Se agradece a la *Revista de Investigación en Salud Pública de México* el permiso para reproducir cuadros y figuras que aparecen en este texto.

** El protocolo de inmunización aquí publicado está en trámite de ser patentado por Laboratorios Dr. Zapata.

2. Efecto de la frecuencia de inmunización y del número de estímulos antigénicos.	46
IV. Discusión	47
Referencias	54

I. Introducción

Cualquier sustancia tiene efectos tóxicos sobre un organismo si es administrada en dosis suficientemente grandes. Sin embargo, algunas sustancias alcanzan su nivel tóxico, y hasta letal, a concentraciones ínfimas, tan pequeñas que pocos o ningún instrumento es capaz de detectarlas por sus características físico-químicas: las toxinas son de este tipo. Producidas por micro y macro-organismos las toxinas son el principal mecanismo patógeno en el tétanos, la difteria y el botulismo, el cólera humano, la gangrena, etcétera, así como en las picaduras por alacrán y arácnidos y mordeduras de algunas serpientes. También, las toxinas participan en la patogénesis de la tifoidea, la peste, el ántrax, la fiebre puerperal y las disenterías bacilares, entre otras enfermedades (1). Consecuentemente, la prevención y el tratamiento de algunas de estas enfermedades incluye procedimientos destinados a inactivar a las toxinas. Los anticuerpos son potentes agentes antitóxicos: inhiben la toxicidad obstaculizando espacialmente el sitio molecular responsable de los efectos tóxicos o desviando metabólicamente a la toxina, impidiendo así su acceso al órgano donde ejerce su acción.

Las medidas inmunológicas para prevenir enfermedades causadas por toxinas consisten en la vacunación de la población expuesta, en la esperanza de inducir niveles altos de anticuerpos antitoxina y así tener una mejor oportunidad de controlar un eventual contacto con la toxina. En un buen número de estas enfermedades, *e.g.* difteria, tétanos, etcétera, la vacunación suele ser eficaz. Sin embargo, como no siempre se tiene certeza de que la vacunación haya ocurrido, o porque ésta ocurrió hace mucho tiempo, o porque la frecuencia de la enfermedad no amerita campañas de vacunación, frecuentemente es necesario inyectar antitoxinas a un enfermo. Las antitoxinas pueden ser de origen animal o humanas, pero estas últimas son caras y es frecuente encontrarse con que no existen en todas las especificidades diferentes, *e.g.* antitétanos, anticólera, antidiftérica, antialacrán, anticrotálica, etcétera. Así que las antitoxinas pre-

paradas en animales diferentes al hombre son casi siempre las únicas accesibles a la población de escasos recursos o las únicas existentes.

El caballo es el animal más frecuentemente utilizado como fuente de antitoxinas pues reúne las características de ser grande, dócil y de sintetizar cantidades apreciables de anticuerpos.

La producción industrial de antitoxinas es un difícil problema de resolver, en parte por la dificultad intrínseca que ofrece el control de la respuesta inmune y en parte, porque los intereses comerciales de las empresas que las producen restringen la libre transferencia de información científica en esta área.

Nosotros hemos tenido la oportunidad de intentar optimizar la producción de antitoxina tetánica para una industria local y aquí informamos de nuestros resultados en la esperanza de que sean útiles a otras empresas y se facilite la producción de estos anticuerpos.

La magnitud de cualquier respuesta inmune depende principalmente de la dosis del antígeno, del número de estímulos antigénicos, del tiempo después de la inmunización, de la frecuencia de estimulación y de la presencia de adyuvantes en el inóculo antigénico (2). Como algunas de estas variables son costosas (dosis de antígeno, tiempo de inmunización) o peligrosas para la salud del animal inmunizado (adyuvantes, re-inmunización), interesa diseñar protocolos de inmunización que maximicen la cantidad de anticuerpos producidos, minimicen la pérdida de animales, y reduzcan la variación entre animales y el tiempo y la dosis de antígenos necesarios para alcanzar la respuesta máxima.

Aquí reportamos los efectos de distintas dosis de *Mycobacterium tuberculosis* muerto en el adyuvante completo de Freud (2) (ACF) sobre la producción de antitoxina tetánica equina y de sus interacciones con la dosis de antígeno, el número de estímulos antigénicos y la frecuencia de aplicación del estímulo antigénico.

II. Material y métodos

1) Efecto de las dosis de antígenos y de *M. tuberculosis* sobre la cinética de producción de antitoxina tetánica

Dieciséis caballos sin experiencia previa con el toxoide tetánico se destinaron a explorar los efectos de la dosis de *M. tuberculosis* en el ACF en la respuesta primaria. Cada caballo fue inmunizado con 5 ml de ACF conteniendo 0, 5, 50 o 500 mg de *M. tuberculosis*

(MTb) muerto emulsificado con 5 ml de una solución de toxoide tetánico (TT 125) preparado de una solución de toxina conteniendo 1.6, 16, 160 o 1600 L+.* La respuesta primaria, expresada en unidades antitóxicas por mililitro de suero (UA/ml), se estimó a las 0, 1, 2, 3 y 4 semanas después del estímulo antigénico.

Los efectos del ACF administrado en la primera inmunización sobre estímulos posteriores se estimaron en los mismos dieciséis caballos al reinmunizarse todos al término de la cuarta semana con 5 0₁₁ de ACF conteniendo 50 mg de MTb y 1600 L+ de TT125.

La respuesta secundaria se estimó de la misma manera que la primaria en las semanas 0, 1, 2, 3, y 4 después de la inmunización secundaria. inmediatamente después los mismos dieciséis caballos se inmunizaron por tercera ocasión con 1600 L+ de TT125, sin ACF, estudiándoseles la respuesta terciaria del mismo modo que las anteriores. El experimento es, entonces, un experimento de dos factores (dosis de MTb y de TT125) con cuatro niveles par factor y una replicación de cada uno de los dieciséis diferentes tratamientos. Las variables de respuesta son las respuestas primaria, secundaria y terciaria estimadas, cada una, en cuatro tiempos diferentes y expresadas como UA por mililitro de suero.

2) *Efecto de la frecuencia de inmunización y del número de estímulos antigénicos en la cinética de producción de antitoxina tetánica*

Para estudiar los efectos de la frecuencia de inmunización y del número de estímulos antigénicos se inmunizaron 33 caballos con 50 mg de MTb en el ACF y 1600 L+ de TT125 en dos ocasiones separadas por un intervalo de 15 días. Una semana después de la segunda inmunización se midió la concentración sérica de UA y se descartaron 8 caballos por no tener concentraciones iguales o mayores de 50 UA por mililitro de suero. Los 25 caballos restantes se separaron en 3 grupos de 6 caballos cada grupo, y un cuarto grupo con 7 caballos. Los tres primeros grupos se reinmunizaron cada uno, dos o tres semanas con 3200 L+ de TT125 (sin adyuvante) hasta la décima semana y luego con 6400 L + en las semanas siguientes y el cuarto grupo, cada cuatro semanas con las mismas dosis de TT125. Todos los caballos se sangraron una semana después de cada estímulo antigénico para determinar la concentración sérica de UA. Se trata pues de un problema de regresión entre la

* L+ es el inverso de la dilución de toxina que es inactivada por una unidad internacional de antitoxina.

concentración sérica de UA y la frecuencia de inmunización y el número de estímulos antigénicos.

3) *Animales*

Todos los caballos utilizados fueron machos, de edades y pesos diferentes, sin experiencia inmunológica previa con la toxina tetánica. Los caballos se distribuyeron sin prejuicios a los diferentes tratamientos de inmunización.

4) *Antígeno y adyuvante*

Como antígeno se utilizó el toxoide tetánico No. 125 (TT125) de Laboratorios Dr. Zapata, elaborado de una solución de toxina tetánica con 320 L +/ml. El TT125 se diluyó en salina de tal manera que 5 ml de la solución contuviese la dosis total deseada de TT125. El *Mycobacterium tuberculosis* H 37 Rv, inactivado en autoclave y liofilizado se utilizó en la preparación del ACF. El ACF se preparó mezclando 85 partes de aceite mineral (Nujol) con 15 partes de lanolina y la cantidad necesaria de MTb para que 5 ml de ACF contuviese la dosis total deseada de MTb. Cinco mililitros de ACF y cinco mililitros de TT125 se emulsificaron en una licuadora inmediatamente antes de ser inyectados a los caballos.

5) *Técnicas de inmunización y sangrado*

En las inmunizaciones primaria y secundaria cada caballo recibió su dosis de MTb y TT125 en 10 ml de la mezcla antígeno-ACF en cuatro sitios diferentes, 2.5 ml por cada sitio. Las inyecciones se hicieron por vía subcutánea en las caras laterales del cuello. En las inmunizaciones ulteriores a la secundaria, los caballos recibieron el TT125 sin adyuvante por la misma vía. Los caballos se sangraron siempre por punción de la vena yugular, nunca en cantidades mayores de 30-40 ml/caballo/sangrado. La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente y después de la retracción del coagulo se separó el suero.

6) *Determinación de UA*

La concentración sérica de UA se torna como el inverso de la dilución de 1 ml de antisuero que inhibió completamente los efectos letales sobre ratones de 1 L + de toxina tetánica.

III. Resultados

1) *Efecto de Las dosis de antígeno y de M. tuberculosis sobre la cinética de producción de antitoxina tetánica*

En la Fig. 1 se grafica el promedio de U A obtenidas en los doce caballos que recibieron dosis de MTb mayores de 0 mg (\overline{X}_{MTb}) y el promedio de los cuatro caballos que no recibieran MTb (\overline{X}_0) contra el tiempo postinmunización y el número de estímulos antigénicos. Es evidente que la concentración de antitoxina sérica aumenta en ambos grupos con el paso del tiempo y con la repetición de los estímulos antigénicos. Sin embargo, los niveles de antitoxina alcanzados por los caballos inmunizados con adyuvante completo son mucho más altos que los que desarrollan los caballos inmunizados sin *M. tuberculosis*. Es de interés señalar que las máximas concentraciones de antitoxina se logran a las dos semanas en la respuesta primaria y a la semana en las respuestas secundaria y terciaria para luego decaer rápidamente en las semanas subsecuentes.

En el Cuadro I se muestra el análisis de varianza de dos factores (dosis de *M. tuberculosis* y dosis de TT125) (3) que prueba la significancia estadística del uso de *M. tuberculosis* para las respuestas secundaria y terciaria, no así para la primaria que resultó de magnitud similar en caballos tratados con y sin *M. tuberculosis*. La dosis de TT 125 no produjo cambios en la respuesta inmune.

2) *Efecto de la frecuencia de inmunización y del número de estímulos antigénicos*

En el Cuadro II se registran las concentraciones séricas de antitoxina tetánica estimadas una semana después de cada estímulo antigénico en caballos sujetos a distintas frecuencias de inmunización. En la Fig. 2 se grafican contra el tiempo de inmunización el promedio de concentraciones séricas de antitoxina tetánica inducido por las distintas frecuencias de inmunización. Es evidente que la formación de antitoxina es asintótica con respecto al tiempo y que la frecuencia de inmunización afecta la velocidad de formación (pendientes de las curvas) y la respuesta máxima (asíntota). La frecuencia de un estímulo antigénico cada cuatro semanas, resultó la de menor velocidad de síntesis y menor respuesta máxima. Des-

pues le siguió la frecuencia de un estímulo cada semana. Las máximas velocidades de síntesis y máximas respuestas se encontraron inmunizando cada dos y tres semanas. Que el efecto se debe a la frecuencia de estimulación y no sólo al número de estímulos antigénicos se evidencia en la Fig. 3, donde a un mismo número de estímulos se observan diferentes respuestas para cada frecuencia de estimulación.

El aumento en la dosis de TT125 de 32000 a 6400 L+ en la decima semana de inmunización sólo afectó, y mínimamente, a la frecuencia rápida.

Con todas las frecuencias de inmunización, exceptuando la de un estímulo cada cuatro semanas, se alcanzaron niveles séricos de antitoxina tetánica mayores de 300 UA/ml entre la séptima y octava semanas después de la inmunización primaria.

IV. Discusión

Nuestros resultados indican que los factores más importantes para elevar la producción de antitoxina tetánica equina son: el uso del adyuvante completo de Freund, cuando menos en los dos primeros estímulos antigénicos, y la administración del antígeno cada quince o veintidós días en el período de hiperinmunización.

No habiéndose demostrado efectos significativos entre dosis diferentes de *M. tuberculosis*, siempre que fuesen iguales o mayores de 5 mg, ni entre dosis diferentes de TT125, siempre que fuesen iguales o mayores de 1.6 L+, se pueden reducir los riesgos y costos de su administración escogiendo las dosis efectivas más bajas de ambos.

A continuación se detalla el protocolo de inmunización que se considera óptimo en base a los resultados obtenidos. La dosis de TT125 utilizada no es la mínima posible sino una intermedia entre ésta y la que habitualmente se usa, considerando la posibilidad de que el efecto de la dosis de antígeno haya sido oscurecido por la variación entre caballos. Sin embargo, en nuestra opinión, se pueden utilizar dosis más bajas de antígeno y obtener esencialmente la misma respuesta.

DÍA

EVENTO

- 0 Primera inmunización con una dosis de toxoide tetánico equivalente a 64000 L+ de toxina tetánica solubilizados en 20 ml

- de salina y homogeneizados con 5 ml de ACF que contengan 5 mg de *M. tuberculosis* o *M. butyricum*.
- 14 Segunda inmunización. Mismo tratamiento.
 - 21 Sangrado de prueba y medición de UA/ml en el suero de cada caballo.
Rechazo de caballos can menos de 50 UA/ml de suero.
 - 28 Tercera inmunización de los caballos aceptados con 6400 L+ toxoide tetánico en 20 ml de salina. Sin adyuvante de Freund.
 - 35 Sangrado de prueba.

De aquí en adelante se repiten los dos últimos pasos hasta que los caballos alcancen concentraciones séricas de antitoxina tetánica mayores de 300 a 400 UA/ml, limite mínima de costeabilidad.

De seguir los principios enunciados debe esperarse:

- a) Reducir los gastos de inmunización al usar menos antígeno y poco adyuvante;
- b) Reducir el tiempo de inmunización preparativa que ha de transcurrir para que el caballo alcance niveles de antitoxina de interés industrial debido al aumento en la velocidad de síntesis al inmunizar cada dos o tres semanas;
- c) Aumentar el rendimiento de antitoxina por cada caballo al aumentarse la respuesta máxima con el uso combinado del adyuvante y la frecuencia de inmunización cada dos o tres semanas;
- d) Aumentar el rendimiento de antitoxina en cada sangrado al cosechar una semana después del último estímulo antigénico, tiempo en que la respuesta anamnésica es máxima.

Es evidente que los principios para ajustar un protocolo de inmunización, cuyo objetivo fue en este caso la producción industrial de antitoxina tetánica, son aplicables a la producción de otras antitoxinas o para simplemente buscar un estado de inmunidad con mínimos costos y riesgos. Los resultados también señalan la importancia de la presencia de *M. tuberculosis* en el inóculo antigénico, así como la de la multiplicidad de estímulos para una respuesta inmune de gran magnitud, variables bien conocidas en inmunología. Menos familiar es la importancia de una frecuencia óptima de estímulos antigénicos, aunque es fácil explicarla. Bajo las suposiciones de la Teoría de Selección Clonal (4), donde el desarrollo de una respuesta inmune necesita de la fijación del antígeno a un conjunto de células receptoras que se diferencian a producir anticuerpos, se

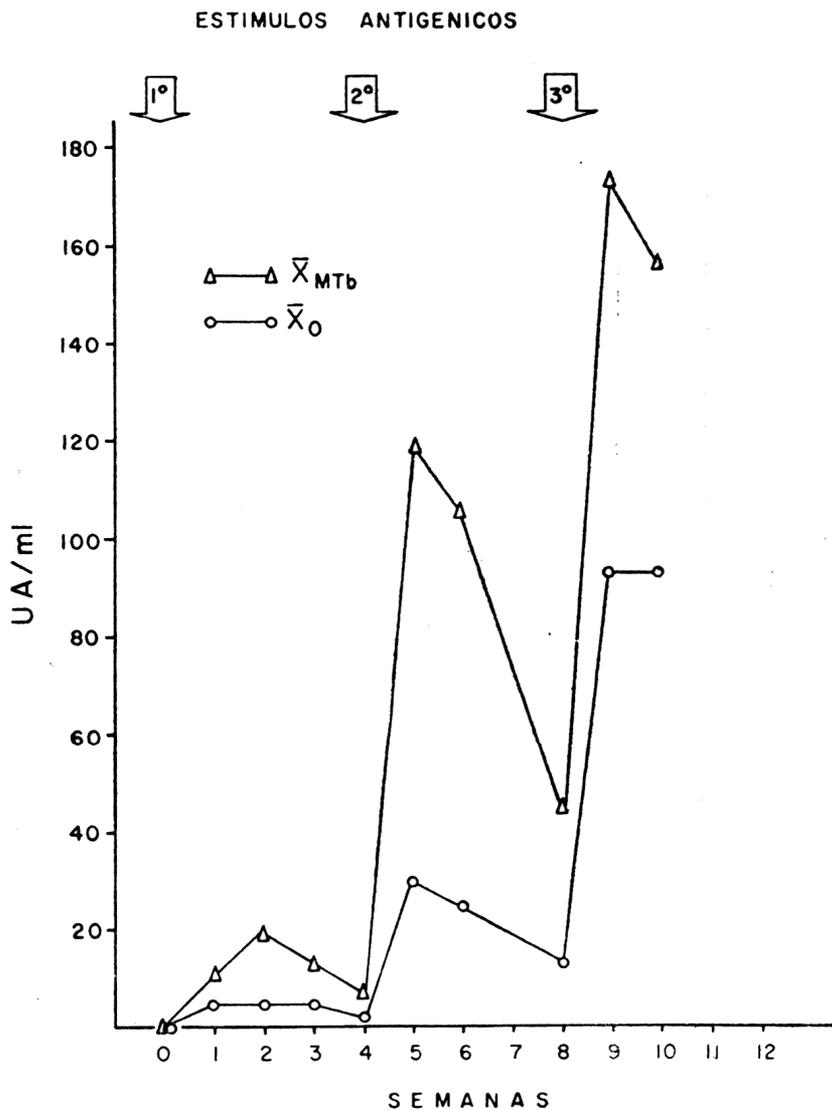


FIG. 1. Respuesta primaria, secundaria y terciaria en caballos con y sin *M. tuberculosis* (MTb) en el adyuvante, expresadas como unidades de antitoxina tetánica por mililitro de suero (UA/ml). \bar{X}_{MTb} es el promedio de todos los caballos que recibieron 5 mg a más de MTb y \bar{X}_0 es el promedio de los caballos que no recibieron MTb en el adyuvante. Es claro que MTb aumenta la producción de antitoxina en todas las respuestas. Los tiempos de máxima concentración de antitoxina sérica son a las dos semanas en la respuesta primaria y a la primera semana en la secundaria y terciaria.

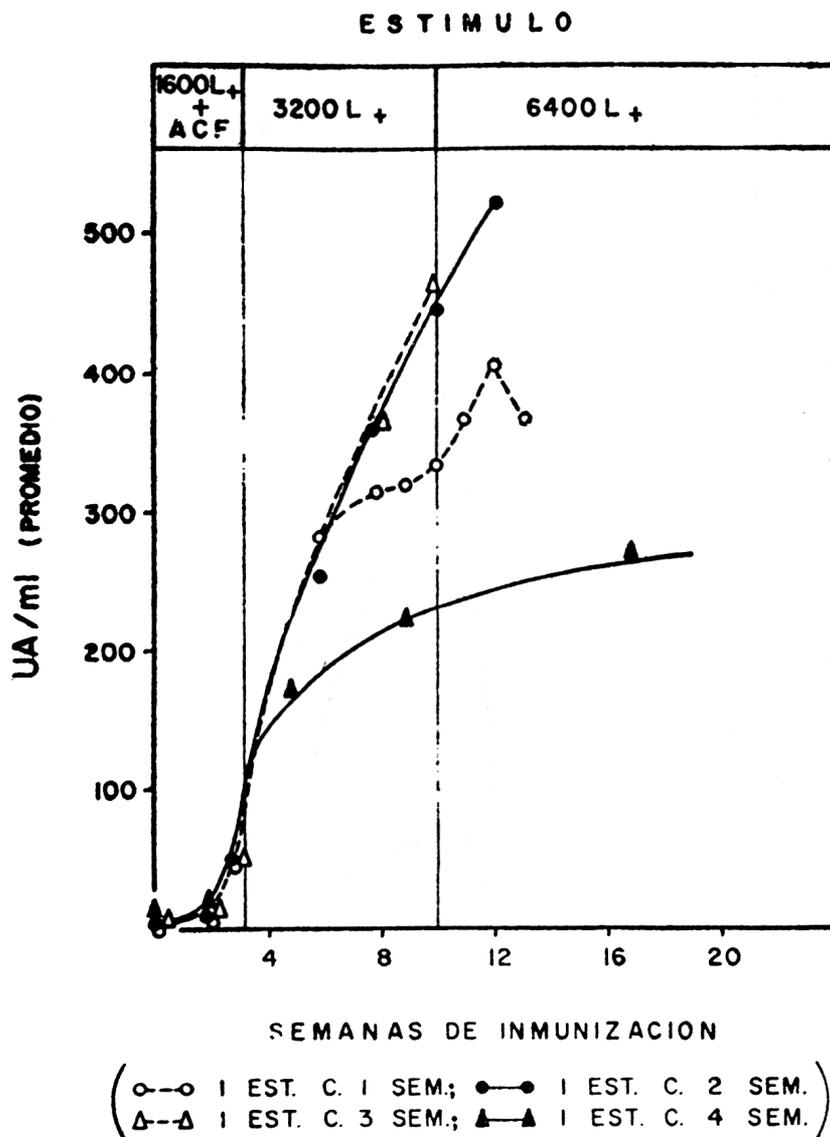


FIG. 2. Cinética de la producción de antitoxina en caballos sujetos a diferentes frecuencias de inmunización. Es evidente que las frecuencias de un estímulo cada dos y tres semanas alcanzan concentraciones mayores de antitoxina y a mayor velocidad que la frecuencia más rápida y más lenta.

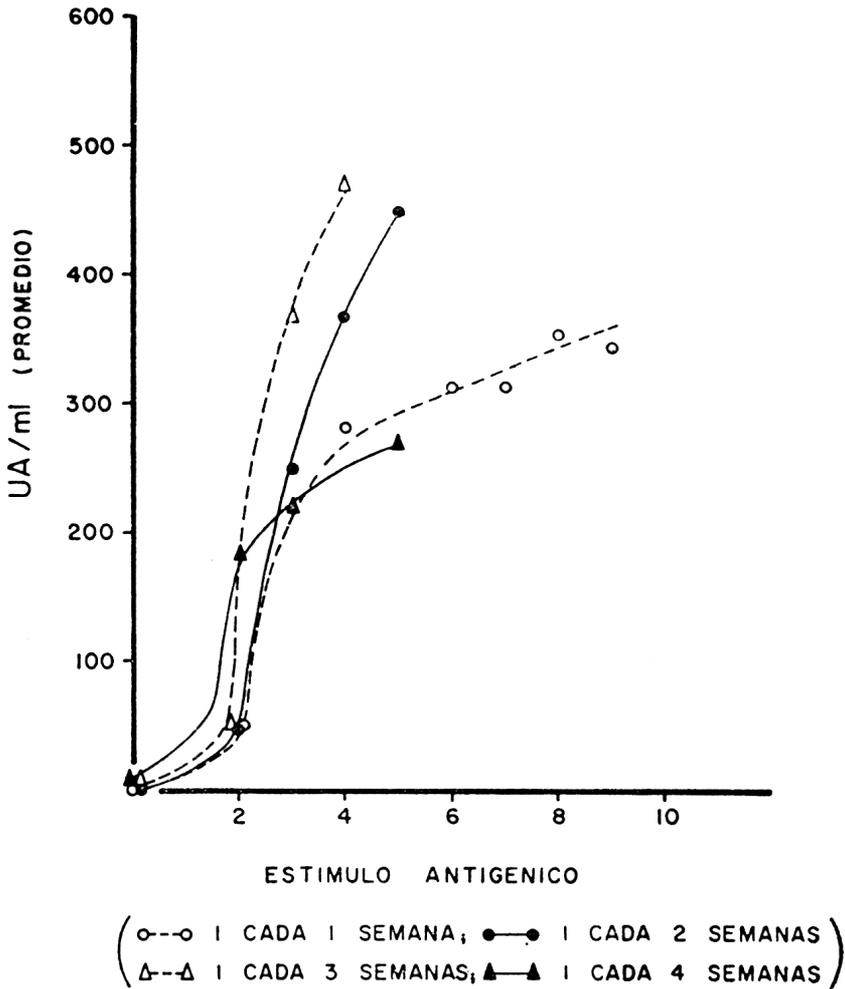


FIG. 3. Efecto del número de estímulos antigénicos y de la frecuencia de estimulación en la producción de antitoxina tetánica. Es claro que el aumento en el número de estímulos aumenta la concentración de antitoxina sérica pero, además, hay un efecto de la frecuencia de inmunización. Las frecuencias de un estímulo cada dos o tres semanas induce mayor producción de antitoxina por unidad de estímulo que la frecuencia mas alta y la mas baja.

CUADRO 1

RESPUESTA PRIMARIA

2a. semana

		Mg MTb				Xi
		0	5	50	500	
L + TT125	1600	7.5	7.5	10.0	75.0	100.0
	160	2.5	2.5	2.5	45.0	52.5
	16	7.5	7.5	2.5	2.5	20.0
	1.6	7.5	7.5	2.5	15.0	95.0
X. j		20.0	25.0	17.5	137.5	267.5

Fuente	gl	SS	MS	F	P
MTb	3	587	195	< 1	> 05
TT125	3	1073	357	< 1	> 05
Residual	9	7746	859		
Total	15	9396			

RESPUESTA SECUNDARIA

1a. semana

		Mg MTb				Xi
		0	5	50	500	
L + TT125	1600	15	300	150	150	615
	160	75	75	15	300	465
	16	15	75	15	15	120
	1.6	5	150	37	150	342
X. j		110	600	217	615	1542

Fuente	gl	SS	MS	F	P
MTb	3	58794	19598	4.31	.01 < P < .05
TT125	3	40894	13631	3.00	.05 < P < .10
Residual	9	40871	4541		
Total	15				

RESPUESTA TERCARIA

1a. semana

		Mg MTb				Xi
		0	5	50	500	
L + TT125	1600	75	300	75	150	600
	160	150	150	25	300	624
	16	75	300	75	75	524
	1.6	75	150	200	300	724
X. j		372	900	372	824	2472

Fuente	gl	SS	MS	F	P
MTb	3	59494	19831	3.738	05
TT125	3	5190	1730	< 1	
Residual	9	47749	5305		
Total	15	112433			

CUADRO 1. Análisis de varianza de dos factores efectuado en los tiempos en que ocurrieron las máximas diferencias entre los tratados con y sin MTb en el adyuvante. En la respuesta no se demostró efecto significativo de ninguno de los factores. En la secundaria y terciaria, en cambio, el factor dosis de MTb contribuyó significativamente a la variación total. La dosis de TT125 no tuvo efectos convincentes sobre la magnitud de ninguna de las respuestas.

CUADRO 2

- 30 -

Frecuencia de Inmunización	Estímulo	1600 L ₊ TT125 y ACF (50 mg MTb)		3200 L ₊ TT125					6400 L ₊ TT125										
		SEMANAS DESPUES DE 1a. INMUNIZACION.																	
		0	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
UNO/1 SEMANA	Estímulo #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
	Caballo #	166	.025	5	50			300		300	400	500	500	600	700				
		167	.025	5	50			300		300	300	300	300	300	300				
		168	.025	5	50			300		300	300	300	300	300	300				
		169	.025	5	50			300		400	300	300	500	500	500				
		170	.025	5	50			300		500	300	300	300	300	100				
		171	.025	5	50			200		300	300	300	300	500	300				
	Promedio	.025	5	50			283		316		333	466	416	366					
	DOS/2 SEMANAS	Estímulo #	1	2			3		4		5		6						
		Caballo #	172	.025	5	50			200		400		500		500				
		174	.025	5	50			200		400		500		600					
		177	.025	5	50			200		300		300		500					
		180	.025	5	50			200		300		300		500					
		181	.025	5	50			400		400		600		600					
		182	.025	5	50			300		400		500		500					
Promedio		.025	5	50			250		366		450		533						
TRES/3 SEMANAS		Estímulo #	1	2				3			4			5					
		Caballo #	193	.025	5	50				400			500			500			
		184	.025	5	50				400			500			500				
		186	.025	5	50				300			300			500				
		187	.025	5	50				300			500			500				
		188	.025	10	50				400			500			300				
		189	.025	5	50				400			500			500				
	Promedio	.025	6	50					366			466			466				
	CUATRO/4 SEMANAS	Estímulo #	1			2					3			4				5	
		Caballo #	114	.025		10			150				75					200	
		103	.025		75			150				150					400		
		154	.025		45			300				300					400		
		151	.025		15			150				300					200		
		156	.025		75			150				150					200		
		30	.025		7			300				300					200		
		159	.025		7			75				300					300		
Promedio	.025		33.5				162				225								

CUADRO 2. Cinética de la producción de anticuerpos en caballos inmunizados a distintas frecuencias con un mismo estímulo antigénico. Es evidente que las frecuencias óptimas son cada dos y tres semanas. Las figuras 2 y 3 muestran representaciones gráficas de estos datos.

puede deducir la existencia de un periodo durante el cual no hay suficientes células receptoras de un nuevo estímulo en virtud de encontrarse en fase de producción. Es decir, el estímulo antigénico actúa como un agente sincronizador del crecimiento y productividad de su clona.

Finalmente, consideramos de interés añadir que los métodos para producir antitoxinas pueden todavía mejorarse en ciertos aspectos. Por ejemplo, es comprensible que fuese el caballo la especie donadora de elección en los tiempos en que no se había industrializado ninguna otra especie animal. Pero ahora, cuando existen varias especies que se mantienen en grandes números para explotarlas como fuentes de alimento (cerdos, ovejas, cabras, vacas, conejos, gallinas) no hay una buena razón para seguir utilizando al caballo. ¿No será posible acoplar una industria productora de reactivos biológicos, como las antitoxinas, a una industria productora de alimentos? Tal acoplamiento ciertamente utilizaría mejor los recursos, haciendo innecesarias las instalaciones para caballos, las pérdidas por hiperinmunización, y vendiendo la sangre a precio de antitoxinas en lugar de al precio de moronga. Tal aumento en la eficiencia de producción generaría, o liberaría, recursos que abatirían los precios de estos reactivos de importancia literalmente vital.

REFERENCIAS

1. Van Heyningcn, W. E.; General Characteristics; en *Microbial toxins*. Academic Press, New York, I -I, 1970
2. Pérez Tamayo, R., Larralde, C., y Kretschmer, R.; *Inmunopatología*. Prensa Médica Mexicana, México, 1969.
3. Snedecor, G. W., y Cochran, W. G.; *Statistical methods*, p. 299, 6a. Ed., Iowa State Univ. Press; Ames, Iowa, USA, 1967.
4. Burnet, F. M., *The clonal selection theory of acquired immunity*. Vanderbilt Univ. Press, :Nashville, 1959.
5. Siskind, G. W., y Benacerraf, B., *Adv. Immunol.* 10, 1, 1969.