

## Purificación del Gangliósido GM<sub>1</sub>

José Luis Pérez Quiñoy ; Luis García Imías

Instituto Finlay, Cuba

### Introducción

El cólera es una infección intestinal causada por el *Vibrio cholerae* O1 y las cepas no O1 del serogrupo O139 (sinónimo Bengal) las cuales producen una toxina colérica que actúa sobre la mucosa del intestino delgado y es responsable de la diarrea característica de la enfermedad acompañada de vómitos, deshidratación, etc. (1).

La toxina colérica es una proteína oligomérica compuesta por una subunidad A1, A2 y cinco subunidades B. Las subunidades B son las responsables de la fijación de la toxina al receptor GM<sub>1</sub> presente en la membrana celular del epitelio del intestino delgado. El GM<sub>1</sub> es un gangliósido cuya conformación estructural permite esta unión específica (2).

La distribución de los gangliósidos varía en las diferentes especies de animales y tejidos. Los cerebros de mamíferos generalmente contienen cuatro gangliósidos mayoritarios: GM<sub>1</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub> y GT<sub>1b</sub> (3).

Se prestó especial interés en la purificación del GM<sub>1</sub>, pues es un material muy útil para los ensayos cuantitativos y cualitativos de la toxina de cólera (CT) y su subunidad B (CTB) así como de los anticuerpos específicos dirigidos contra ellas.

### Materiales y Métodos

En el presente estudio se utilizó GM<sub>1</sub> comercializado por las firmas SIGMA y BOEHRINGER como patrones de referencia para estimar la calidad y eficacia de nuestro producto, evaluado a través de la cromatografía en capa fina y los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).

Se utilizó como materia prima masa de gangliósidos obtenida a partir de cerebros de reses jóvenes en el Laboratorio Farmacéutico "Mario Muñoz", por el método cloroformo-metanol reportado por Svennerholm y Fridman en 1979 (4).

Para llevar a cabo la purificación del gangliósido GM<sub>1</sub> a partir de esta mezcla, se realizó el siguiente método: Dos gramos del producto (masa de gangliósidos) se disuelven en 50 ml de una mezcla de cloroformo-metanol-agua (65:25:4 v/v) y se aplica en una columna cromatográfica de 300 x 50 mm empacada con: silica gel 60 (MERCK), y silica gel G 200 gr (MERCK), equilibrada con una mezcla de cloroformo-metanol (9:1 v/v). Se eluye con 2L de cloroformo-metanol-agua (v/v), según los siguientes sistemas de elución, bajo presión de nitrógeno: Sistema A: 65:25:4, B: 60:32:7, C: 60:35:8. La polaridad aumenta de A-C.

Se colectan fracciones de 25 ml ajustadas a un flujo de 7-9 ml/min y posteriormente se concentran por evaporación de aproximadamente el 50% del volumen.

Para la evaluación de estas fracciones se aplican 5 µl (5-10 µg de ácido siálico) en placa cromatográfica TLC precubiertas con silica gel 60 (MERCK) y se corren en cloroformo-metanol-tampón (60:35:8.2 v/v). Las placas se secan en la estufa 5 minutos a 110 °C.

Se aplica como revelador (Resorcinol-HCl) según lo descrito por Svennerholm 1963 (5) en forma de spray utilizando un frasco atomizador.

La placa cromatográfica ya atomizada se coloca rápidamente boca abajo encima de un cristal bien limpio precalentado a 110°C ± 2 durante 5 minutos. luego se invierte la posición y se mantiene durante 30 minutos más a la misma temperatura. Los gangliósidos se observan como bandas de color azul morado intenso. (3)

Como procedimiento previo a la cromatografía en capa fina de las fracciones colectadas por elución de la columna, se realizó una placa exploratoria que no es más que la aplicación de 5 µl de diferentes fracciones en una placa subdividida en tantas partes como fracciones a aplicar y atomizadas con Resorcinol-HCl en busca de una respuesta positiva de

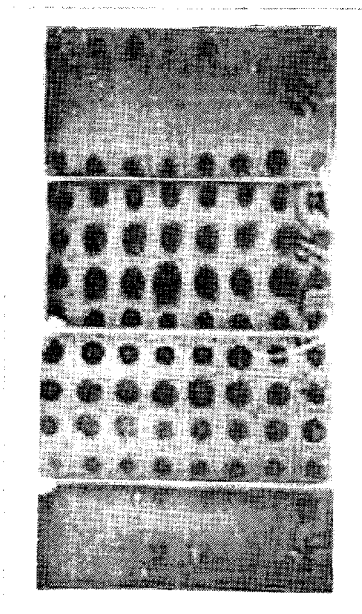
aquellas fracciones que contengan gangliósidos para proceder a su evaluación.

Como otro criterio de evaluación se utilizó el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) para lo cual se emplearon placas (NUNCLON) de fondo plano y CTB (Sigma). La técnica fue desarrollada según lo descrito por Levine *et al* 1985 (6).

**Resultados y Discusión**

Como resultado de la cromatografía en columna con sílica gel G, se recogieron 240 fracciones de 25 ml que fueron concentradas a la mitad del volumen por evaporación del solvente orgánico.

En la **Figura 1** los resultados de la placa exploratoria permiten, a través de una reacción positiva al Resorcinol-HCl, ubicar gangliósidos dentro de toda la gama de fracciones cromatográficas. Aproximadamente hasta la fracción 90 se encuentran en mayor proporción lípidos neutros y péptidos de bajo peso molecular que dan una coloración rosada oscura, negativa al Resorcinol, o no aparece respuesta alguna. A partir de la fracción 220 la reacción es nuevamente negativa, no se apreciaron manchas de ningún color en la placa.



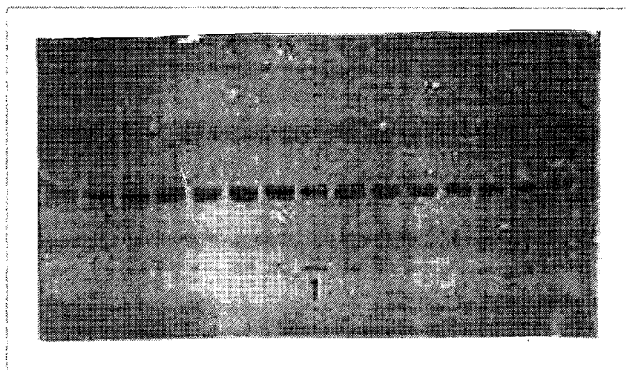
**Figura 1.** Placa Explorativa. Muestra la ubicación de los gangliósidos en la gama de fracciones colectadas durante la Cromatografía en columna. Se aplicaron 5 µl por fracción, la placa fue atomizada con resorcinol-HCL. Aproximadamente hasta la fracción 90 la respuesta fue negativa al resorcinol, fue positiva entre la fracción 90 y 220, después fue negativa nuevamente.

Con el objetivo de localizar el GM<sub>1</sub>, estas fracciones son sometidas a una cromatografía en capa fina, junto a patrones de referencia, frente al revelador Resorcinol-HCl. La identificación de cada gangliósido se realiza comparando la movilidad de la muestra con la de patrones puros.

Se consideró que la elución de la columna con el **sistema A**, permitió separar los elementos contaminantes y, parcialmente, el gangliósido GM<sub>3</sub>, así mismo con el **sistema B** se obtuvo el resto de GM<sub>3</sub>, GM<sub>2</sub>, GM<sub>1</sub> puro y GM<sub>1</sub> mezclado con GD<sub>3</sub> y GD<sub>1</sub> a; con el **sistema C** logramos el resto de GD<sub>1</sub> a, GD<sub>1</sub> a mezclado con GD<sub>1</sub> b y GT<sub>1</sub> b.

La secuencia de migración de los componentes de la mezcla durante la elución en la columna está fundamentada por la estructura molecular de cada componente, reservándose un rol muy importante a los grupos carboxilos presentes, los cuales definen la polaridad del compuesto. Cada sistema de elución (**A,B,C**) difiere del otro precisamente en la polaridad y los componentes de la mezcla migran por afinidad con el sistema en cuanto a la polaridad.

En la **Figura 2** se muestran resultados de la cromatografía en capa fina de algunas de las fracciones. El patrón de GM<sub>1</sub> puro está aplicado en el centro de la placa; se observa hacia la extrema derecha un grupo de fracciones donde el GM<sub>1</sub> está puro, en las muestras de la extrema izquierda el GM<sub>1</sub> está contaminado fundamentalmente por GD<sub>3</sub> y GD<sub>1</sub> a.



**Figura 2.** Cromatografía en capa fina. El GM<sub>1</sub> de la firma SIGMA como patrón de referencia está señalado con la flecha, se observan fracciones hacia el extremo derecho de la placa que contienen GM<sub>1</sub> puro, las de la extrema izquierda presentan GM<sub>1</sub> contaminado con otros gangliósidos. La placa fue corrida en Cloroformo-Metanól-Tampón (60:35:8.2) y revelada con resorcinol-HCL. Se aplicaron 5 µl de cada fracción y del patrón de referencia.

Las fracciones que contenían GM<sub>1</sub> puro según la evaluación en placa, fueron mezcladas y sometidas a rotoevaporación, obteniéndose un rendimiento de 130 mg que fueron posteriormente liofilizados.

Ha sido demostrado por numerosos autores (6), (7), (8) y (9) que el gangliósido GM<sub>1</sub> constituye un receptor específico de la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) *in vivo* e *in vitro*. Esta propiedad del GM<sub>1</sub> ha permitido su uso como recubrimiento en un ELISA para detectar y cuantificar toxina de cólera y los anticuerpos específicos antitoxina.

En el presente estudio se comparó la utilidad del GM<sub>1</sub> obtenido por nosotros con uno comercial de la firma Boehringer, como recubrimiento en un ELISA a una concentración de 1µg/ml.

En la Figura 3 se presentan las curvas de densidad óptica contra el logaritmo de la concentración de toxina (ng/ml) frente a ambos GM<sub>1</sub>.

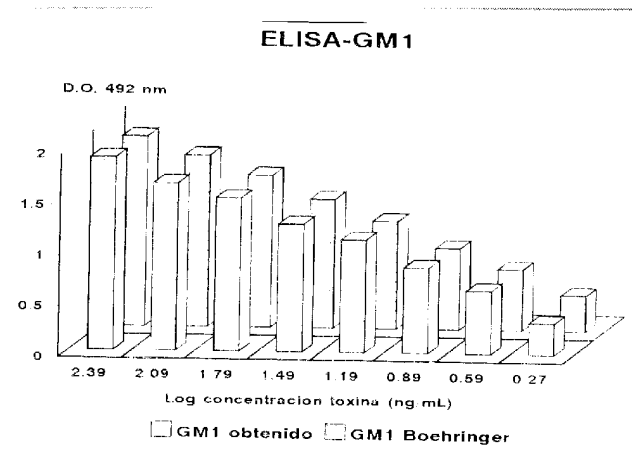


Figura 3. Representa las Curvas de Densidad Óptica contra el logaritmo de la concentración de toxina (ng/ml) frente a 1µg/ml de ambos GM<sub>1</sub> (el obtenido y el de la firma BOEHRINGER) como recubrimiento en un ELISA.

### Referencias

1. Waidar, M. K.; Mekalanos, J.J. (1994). Infect. Immun. 62, 72-78.
2. Spangler, B. D. C. (1992). Microbiol Rev. 56, 622-647.
3. Ando Susumo, Nan-chen chang, and Robert K. Yu. Analytical Biochemistry 89. 437-450 (1978).
4. Svennerholm, L.; Fredman, P. (1979). Biochim. Biophys. 617, 97-109.
5. Svennerholm, L (1963). Neurochem. 10. 613-623.
6. Levine, M.M., C.R.Young, R.E.Black, Y.Takeda, and R.A. Finkelstein. (1985). J.Clin Microbiol. 21. 174-179.
7. Jobling, M. G.; Holmes, R.K. (1992). Infect. Immun. 60, 4915 - 4924.
8. Holmgren J. Infect Immun. (1973); 8. 851-859.
9. Pacuszca.T.; Bradley,R.M.; and Fishman, P.H. Biochemistry Vol 30. No 10 (1991) pp 2563-2570.

Los valores de densidad óptica de los diferentes puntos son muy similares para ambos recubrimientos, lo que se evidencia con una dependencia lineal y un coeficiente de regresión de 0.9938 como se observa en la Figura 4, que muestra la ecuación y el coeficiente de regresión entre las determinaciones efectuadas con ambos productos, utilizados como recubrimiento en el ELISA para la detección de CTB. Estos resultados juntos al de la cromatografía en capa fina permitieron plantear que el GM<sub>1</sub> obtenido por nosotros presenta grado de pureza y actividad específica comparable con el de la firma Boehringer y que su utilización como recubrimiento en un ELISA para detectar y cuantificar toxina de cólera, así como sus anticuerpos específicos, asegura resultados verdaderamente confiables.

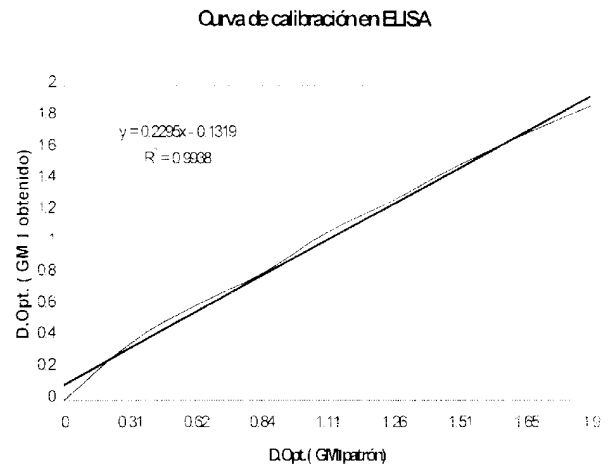


Figura 4. Representa la curva de calibración en el ELISA del GM<sub>1</sub> obtenido en el laboratorio y el empleado como patrón.