

**OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA
LA PURIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS G DE SUEROS
HUMANOS INMUNES AL VIRUS DEL DENGUE**

Lic. Elizabeth Santana Hernández

*Universidad de Matanzas – Sede “Camilo Cienfuegos”, Vía
Blanca Km.3, Matanzas, Cuba. elizabeth.santana@umcc.cu*

Resumen

El virus del dengue presenta una gran morbilidad y distribución geográfica. Actualmente no existe una vacuna o tratamiento antiviral efectivo contra la infección. Los anticuerpos que se levantan durante la misma modulan los síntomas de la enfermedad, específicamente las inmunoglobulinas G, por lo que podrían contribuir grandemente al desarrollo de vacunas, de ahí la importancia de obtenerlas en forma purificada. En este trabajo se comparan tres calidades de la matriz de exclusión molecular *Sephadex G-25 (Fine, Medium y Coarse)* y, dos matrices de intercambio aniónico: dietilaminoetanol DE-52 y dietilaminoetanol *Sepharose* a 1mL, 2 mL y 3mL para combinarlas en una cromatografía de lecho mezclado Intercambio Aniónico/Exclusión Molecular durante la purificación de IgG a partir de sueros humanos inmunes a la infección por el virus del dengue. Los mejores resultados en cuanto pureza y recobrado se obtuvieron para *Sephadex G-25 Medium* y la combinación *Sephadex G-25 Medium/DE-52 (2mL)*.

Palabras claves: *Virus del dengue; Inmunoglobulina G; Purificación; Cromatografía de exclusión molecular; Cromatografía de intercambio iónico.*

Introducción

El dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos más importante a nivel mundial, en términos de números de casos y distribución geográfica. A pesar de los muchos esfuerzos realizados en las últimas cuatro décadas, no existe actualmente una vacuna autorizada disponible o un tratamiento antiviral efectivo contra la infección por el virus del dengue (VDEN) (Galán, 2014).

Este *Arbovirus* pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* y se transmite a los humanos a través de la saliva del mosquito. Específicamente, el mosquito *Aedes aegypti* se considera el principal vector (Guzmán *et al.*, 2012) en numerosos países de las zonas tropicales y subtropicales del planeta (Bhatt *et al.*, 2013). Existen cuatro serotipos del VDEN (VDEN1, VDEN2, VDEN3 y VDEN4) los cuales están relacionados genéticamente y son reconocidos como serotipos diferentes por su variación en alrededor de un 30% de la secuencia aminoacídica de la proteína de envoltura (E) (Midgley *et al.*, 2012).

Durante una infección primaria con uno de los serotipos del VDEN se ponen en marcha diversos mecanismos de la inmunidad innata seguida de una fuerte respuesta inmune adaptativa (Tolfvenstam *et al.*, 2011). Los anticuerpos (Acs) secretados reaccionan de forma cruzada con todos los serotipos del virus. A pesar de esto, los individuos sólo desarrollan una inmunidad protectora a largo plazo contra el serotipo responsable de la infección primaria (inmunidad homotípica), mientras que la protección contra los otros serotipos (inmunidad heterotípica) es a corto plazo (Halstead, 2003). En estos tipos de infección, los anticuerpos anti-dengue de tipo inmunoglobulina M (IgM) aparecen de 4-5 días después del comienzo de la fiebre y son medibles hasta luego de tres meses. Pero los anticuerpos IgG aparecen alrededor de una semana después del comienzo de los síntomas y

alcanzan un máximo varias semanas después de la infección. Posteriormente declinan a niveles bajos que persisten durante décadas (Koraka *et al.*, 2001). Durante una infección secundaria con el VDEN, los anticuerpos surgen a partir de células B vírgenes y de células B de memoria generadas en la infección primaria que conllevan al aumento rápido de las IgG específicas al dengue (Alwis *et al.*, 2011).

Los títulos de IgG de sueros específicos del VDEN son mucho mayores en infecciones secundarias al compararse con los títulos de las infecciones primarias. Por razones que no se han dilucidado totalmente, la respuesta de IgM en las infecciones secundarias de dengue, son variables y en algunos casos, indetectables (Wahala y de Silva, 2011).

Entre las proteínas estructurales que presenta la partícula viral, la proteína E juega un papel fundamental en la unión a los receptores celulares, la fusión de membranas y el ensamblaje de los viriones. La misma presenta tres dominios estructurales (DIE, DIIIE y DIIIE) y constituye el antígeno mayormente representado en la superficie viral, por lo que constituye el blanco principal de los anticuerpos neutralizantes contra el virus del dengue (Wahala y de Silva 2011). Por estas razones, muchos de los estudios encaminados a dilucidar los epítomos serotipo específicos o de reactividad cruzada en el virión, que son fundamentales en el proceso de neutralización del virus, se concentran en esta proteína.

El dominio III de la proteína de envoltura (DIIIE) presenta un 65% de homología entre los cuatro serotipos virales (Halstead *et al.*, 2005). Además, numerosas evidencias experimentales indican que forma parte de la región de interacción de la proteína E con los receptores celulares. Por ejemplo: se localiza en la región más prominente de los viriones, lo que le confiere un mayor grado de accesibilidad en la interacción con los sitios receptores (Chin *et al.*, 2007); tiene una estructura similar a la de las regiones constantes de las inmunoglobulinas lo que permite que se asocie a una gran variedad de proteínas de adhesión celular (Modis *et al.*, 2005); presenta parches hidrofílicos cargados positivamente que podrían unirlos a los sulfatos de heparina para la concentración del virus en la superficie celular (Chen *et al.*, 1996) y, se ha visto que las formas solubles del dominio pueden bloquear la infección por el virus del dengue (Chu *et al.*, 2005). También, algunas mutaciones severas que afectan la unión al receptor están localizadas en esta región (Roehrig, 2003).

Por otra parte, en el laboratorio Antivirales Dengue del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), como parte del proyecto de “Desarrollo de moléculas antivirales contra el dengue”, se han aislado e identificado proteínas del plasma sanguíneo como la alfa 2-macroglobulina y la proteína C reactiva, funcionalmente relacionadas, capaces de interactuar con el DIIIE. En este sentido, los Acs se convierten en un modelo para el estudio de las interacciones con este dominio, puesto que modulan la infección y contribuyen grandemente al avance de vacunas contra este virus, de ahí la importancia de obtener las inmunoglobulinas G en forma purificada.

Anteriormente, dicho laboratorio implementó una técnica cromatográfica de lecho combinado para la purificación de las IgG presentes en el suero humano (SH) de pacientes convalecientes a la infección por el VDEN, con la matriz de Intercambio Aniónico DE-52 y

CD de Monografías 2015

(c) 2015, Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”

la matriz de Exclusión Molecular *Sephadex G-25 Medium* (IA/EM). La misma mostró los mejores resultados en cuanto a pureza y recobrado de esta inmunoglobulina al comparar con otros tipos de cromatografías evaluadas: cromatografía de afinidad por proteína A y cromatografía de afinidad negativa con el estuche comercial *Melon*®. Sin embargo, un análisis cualitativo y cuantitativo de las muestras de IgG obtenidas en la purificación por IA/EM bajo las condiciones empleadas, mostró cierta pérdida de estas proteínas de la fracción no fijada (FNF) donde debían eluir respecto a su concentración en el suero de origen.

Por dichas razones, en este trabajo se propuso como objetivo general:

Optimizar los parámetros de altura y calidad de las matrices de Intercambio Aniónico y Exclusión Molecular para la purificación de IgG mediante cromatografía combinada IA/EM a partir de sueros humanos inmunes al VDEN.

Constituyeron objetivos específicos:

1. Comparar el grado de pureza y recobrado de las fracciones de IgG de sueros humanos inmunes al VDEN a partir de tres calidades de la matriz *Sephadex G-25* (*Fine*, *Medium* y *Coarse*) combinadas con la matriz de intercambio aniónico DE-52 a un volumen constante.
2. Evaluar el efecto de la altura y la calidad de las matrices de intercambio aniónico DE-52 y DEAE *Sepharose* en la pureza y recuperación de las IgG purificadas de sueros humanos inmunes al VDEN, mediante la cromatografía IA/EM con la mejor *Sephadex G-25* comparada.

Materiales y métodos

Sueros humanos

Los sueros humanos empleados en este estudio: SH 01, 51 y 59 se obtuvieron con el consentimiento previo e informado por escrito de los entrevistados. Estas muestras de sangre pertenecen a individuos que mostraron los síntomas característicos de una infección por el VDEN durante la epidemia 2001-2002 en La Habana, donde el serotipo responsable aislado fue el VDEN3. Todas las extracciones de sangre se conservaron a -20 °C.

Proteínas

Los dominios recombinantes DIII E1 y DIII E4 se obtuvieron previamente por expresión heteróloga en *Escherichia coli* y por procedimientos de purificación establecidos en el Servicio de Purificación de Proteínas del CIGB. Los fragmentos de secuencia específicos de la proteína E y las cepas virales utilizadas para cada serotipo se describen en la tabla I.

Tabla I. Datos de las proteínas recombinantes DIIIE

Proteína	Serotipo viral	Genbank acc. No.†	Residuos en la proteína E	Cepa viral
DIIIE1	1	AF425621	289-399	PRS 288690
DIIIE4	4	AF326573	289-399	Dominica 814669

† <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Purificación de inmunoglobulinas G mediante cromatografía IA/EM

En la optimización del proceso de purificación de las IgG se procesaron tres sueros humanos (SH 01, SH 51 y SH 59) a partir de la cromatografía de lecho combinado IA/EM, según el protocolo descrito por Sumar y colaboradores en 1990 (Sumar *et al.*, 1990).

Para evaluar el posible efecto de las diferentes calidades de la matriz *Sephadex* G-25 (*Fine*, *Medium* y *Coarse*) (Farmacia, Suiza) en la purificación de estas proteínas, se empaquetaron tres columnas (10 cm longitud, 0,5 cm radio) con 1 mL de la matriz de intercambio aniónico dietilaminoetanol celulosa (DEAE-celulosa) DE-52 (Whatman BioSystem, Inglaterra) y 10 mL de *Sephadex* G-25 de cada tipo respectivamente. De igual forma, para el análisis de la influencia de las matrices de intercambio aniónico, se empaquetaron columnas cromatográfica (10 cm longitud, 0,5 cm radio) con volúmenes variables de las matrices DE-52 (2 y 3 mL) y *Sepharose* (1; 2 y 3 mL) con la calidad de la matriz *Sephadex* G-25 que mostró los mejores resultados en la purificación de las IgG, descrita con anterioridad. Una vez empaquetadas las columnas, se equilibraron con tampón K₂PO₄ 20 mM, pH 7,0 (8 veces el volumen total de la matriz). Posteriormente, las muestras de sueros a purificar se centrifugaron a 12 000 rpm durante 5 minutos para eliminar las proteínas precipitadas por los procesos de congelación-descongelación. Luego se realizó una dilución 1:2 de 125 µL de suero centrifugado en el tampón K₂PO₄ (20 mM, pH 7,0) y se aplicaron 250 µL de muestra en cada corrida cromatográfica. Las IgG eluyeron a un flujo de 0,5 mL/min y se colectaron en la primera FNF, con un volumen variable que osciló entre 3,0 mL y 4,5 mL. El proceso de purificación se monitoreó a través del programa AdqOneNIUSB 4.0 gentilmente donado por su autor (Dirección de Desarrollo Tecnológico, CIGB). El resto de las proteínas del suero fijadas a la matriz eluyeron durante el lavado de la columna con 0,5 mL de la solución de K₂PO₄ (20 mM, pH 7,0) en presencia de 1 M de KCl. Todas las muestras de inmunoglobulinas purificadas se conservaron a -20 °C.

Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de las proteínas totales de los sueros y de los picos correspondientes a las IgG purificadas por cromatografía IA/EM se llevó a cabo mediante el método del ácido bicinónico (BCA). Para ello se utilizó un estuche comercial (Pierce, Estados Unidos) y se siguieron las instrucciones del fabricante para los ensayos en placas de 96 pozos. La curva de calibración se construyó con un rango de diluciones de 0,025-2 mg/mL de la albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma, Estados Unidos). Para cuantificar las proteínas totales de los sueros empleados se realizó previamente una dilución 1:100 de los mismos en tampón PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, K₂HPO₄ 1 mM, NaCl 100 mM, KCl 2 mM, pH 7,4). La

absorbancia se midió a 562 nm en un espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Scientific, Finlandia). El ajuste lineal de los valores de absorbancia de la curva patrón se realizó con el programa *Microsoft Excel* del paquete *Office 2007* para *Windows*.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas de los SH 01, 51 y 59 y de las fracciones cromatográfica colectadas se separaron mediante electroforesis (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 12,5 % el separador y 4 % el concentrador, según las condiciones estándar de Laemmli (1970) (Laemmli, 1970). Las muestras se diluyeron 1:1 (v/v) en tampón muestra en condiciones reductoras (SDS 1 %, Tris-HCl 0,3 mM, -mercaptoetanol 2 mM, pH 6,8) y se calentaron durante 5 minutos a 95 °C antes de su aplicación. La separación electroforética se llevó a cabo en una cámara *Mini-PROTEAN II* (BioRad, Estados Unidos) con el tampón de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %, pH 8,3), a una corriente fija de 30 mA por gel controlada por una fuente *Electrophoresis Power Supply-EPS 601*.

Para la detección de las bandas, los geles se incubaron en una solución de fijación compuesta por etanol: ácido acético: agua (4:1:5) durante 1 h. Luego se tiñeron toda la noche en agitación con una solución al 0,25 % de *Coomasie Blue R-250* (Sigma, Estados Unidos) en etanol: ácido acético: agua (5:1:5) a 25 °C.

Ensayo Inmuno-enzimático en Fase Sólida (ELISA)

- ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos específicos anti-DIIIIE

Los ELISA se desarrollaron en placas de 96 pozos (*Costar 3590*). Estas se recubrieron con 50 µL/pozo de los dominios DIIIIE1 y DIIIIE4 a 10 µg/mL disueltos en tampón de recubrimiento (Na₂CO₃ anhidro 50 mM, NaHCO₃ 50 mM, pH 9,5) y se incubaron 1 h a 37 °C. Luego se bloqueó con 200 µL/pozo de una solución de BSA al 1 % en PBS-Tween 0,05 % (PBS-T) y se incubaron las placas 1 h a 37 °C. Posteriormente se realizaron tres lavados con 150 µL/pozo de PBS-T. Luego se añadió 50 µL/pozo de 4 diluciones seriadas 1:4 en PBS-T a partir de una dilución 1:100 de los SH y sus correspondientes fracciones de IgG purificadas por IA/EM. Las placas se incubaron 1 h a 37 °C y pasado este tiempo se lavó con 150 µL/pozo de PBS-T. Para la detección de las IgG anti-DIIIIE se aplicó 50 µL/pozo de una dilución 1:8000 del conjugado peroxidasa anti-IgG humano (Fc específico) (Sigma, Estados Unidos) disuelto en PBS-T y se incubó nuevamente 1 h a 37 °C. Seguidamente se realizaron tres lavados por placa con 150 µL/pozo de PBS-T. Luego se añadió 50 µL/pozo de la solución sustrato (1 mg de orto-fenilendiamina/1 mL de tampón citrato de sodio a 0,15 M, pH 5,0 /1 µL de H₂O₂ al 30 %) y se incubaron las placas 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 µL/pozo de una solución de H₂SO₄ (ac) al 5,4 % y se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placas Multiskan GO (Thermo Scientific, Finlandia).

Cada punto experimental se evaluó por duplicado y los valores de densidad óptica (DO) correspondientes se promediaron. Se definió la reactividad por dilución a la razón entre el promedio de las réplicas de cada señal y el valor del control negativo empleado, (pozos recubiertos con BSA como antígeno) en la misma dilución evaluada. Como criterio de

positividad se tomaron las DO correspondientes a las diluciones del suero o fracciones de IgG purificadas, para las cuales se detectó una señal de DO al menos tres veces superior a la señal obtenida para el control negativo del ensayo. El título se definió como la mayor dilución para la cual se cumplió el criterio de positividad. Los datos se analizaron con el programa estadístico *GraphPadPrism v5.0*.

- ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti-VDEN

De forma general se siguió el protocolo descrito en el sub-acápite anterior, con las siguientes modificaciones: 1) se recubrieron placas de 96 pozos (*Costar 3590*) con 50 μ L/pozo del anticuerpo monoclonal murino 4G2 de reactividad cruzada con los cuatro serotipos del VDEN (suministrado por el CIGB de Sancti Spíritus) a 10 μ g/mL en tampón de recubrimiento, 2) posterior al paso de bloqueo, se añadieron 50 μ L/pozo de una mezcla equivalente de antígenos virales de los serotipos VDEN 1; 2; 3 y 4 (virión completo) obtenidos del sobrenadante de células Huh-7.5 infectadas previamente con estos serotipos en ausencia de suero fetal bovino, 3) seguidamente las placas se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Los títulos de los anticuerpos IgG anti-VDEN se determinaron de igual modo que en el ensayo de ELISA anti-DIIIE.

Resultados y Discusión

Selección de una calidad de matriz Sephadex G-25 para la purificación de las IgG

En ensayos realizados con anterioridad en el laboratorio se escogió la cromatografía de lecho mezclado IA (DE-52)/EM (*Sephadex G-25 Medium*) de entre otras, basadas en principios diferentes, para la purificación de IgG a partir de muestras de sueros humanos convalecientes a la infección por el VDEN. No obstante, aunque este método cromatográfico mostró los mejores resultados respecto a los otros analizados, se evidenció cierta pérdida de IgG durante la purificación. Por lo que se decidió optimizar algunos parámetros del proceso de obtención de la inmunoglobulina G (calidad y volumen de las matrices) tanto para la exclusión molecular como para el intercambio aniónico, en base al formato de lechos mezclados.

Entre las matrices empleadas para esta cromatografía combinada se encuentra *Sephadex G-25*. La misma constituye un gel compuesto por perlas macroscópicas sintéticamente derivadas del polisacárido dextrano, el cual es muy empleado en la técnica de filtración en gel. El rango de fraccionamiento para proteínas globulares oscila entre 1 y 5 kDa, por lo que retiene en mayor medida moléculas de pequeña talla, como por ejemplo péptidos. Para este tipo de matriz se han descrito diferentes calidades (*Superfine, Fine, Medium y Coarse*) empleadas en el fraccionamiento de mezclas complejas de proteínas, las cuales varían en dependencia del tamaño de sus perlas hidratadas tal y como se muestra en la Tabla II.

Tabla II Características generales de la matriz *Sephadex G-25*

Gel (Sephadex G-25)	Rango de pH (trabajo)	Talla de la partícula (Rango de la perla hidratada en μm)	Rango fraccionamiento (Mr)
Coarse		170-520	
Fine	2-13	35-140	1000-5000 (Da)
Medium		85-260	
Superfine		17-70	

Por lo que, para evaluar si en la robustez y rendimiento de la purificación de las IgG mediante IA/EM influye la calidad de este tipo de matriz, se realizó el procesamiento de los sueros 01 y 59 con *Sephadex G-25 Fine, Medium y Coarse*. En esta cromatografía se empleó la resina DE-52 como intercambiador aniónico a un volumen constante de 1 mL para las tres calidades de matriz de exclusión molecular mencionadas.

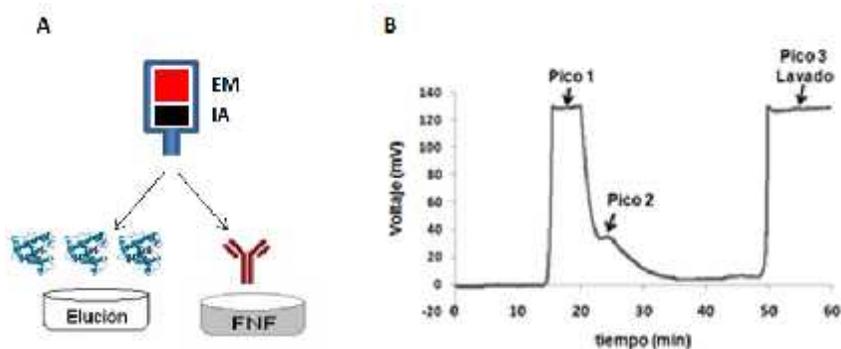


Figura 1. Cromatografía de lecho combinado Intercambio Aniónico/Exclusión Molecular. (A) Esquema de purificación de las IgG con las matrices de IA (DE-52 y DEAE *Sepharose*) y de EM (*Sephadex G-25 Fine, Medium y Coarse*). Las IgG se colectaron en la primera fracción no fijada (FNF) y las proteínas unidas a la matriz en el lavado de columna. (B) Cromatograma tipo de la purificación de IgG mediante la cromatografía combinada IA/EM. El pico 1 y 2 se corresponden con las fracciones de IgG y transferrina respectivamente, el pico 3 con el lavado de la columna.

En la figura 1A se representa el esquema de purificación en el cual se basó la cromatografía combinada y en la sección 1B el cromatograma tipo que debe obtenerse durante la purificación de IgG. Las inmunoglobulinas purificadas son colectadas en la primera fracción no fijada correspondiente al pico 1 del cromatograma y la elución de las proteínas del suero unidas a la matriz en el lavado de la columna o pico 3. Además, se puede observar la presencia de un pico 2 donde eluye una segunda fracción no fijada del suero la cual se corresponde con la proteína transferrina. La misma tiene una elución muy cercana a la de las IgG, y por tanto, existe cierta posibilidad que las inmunoglobulinas se contaminen con

dicha proteína durante el proceso de purificación. Esta posibilidad es aún mayor si no se cuenta con una buena resolución de los picos.

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos de la purificación de las IgG del SH 01 para cada una de las tres calidades de la matriz *Sephadex G-25*.

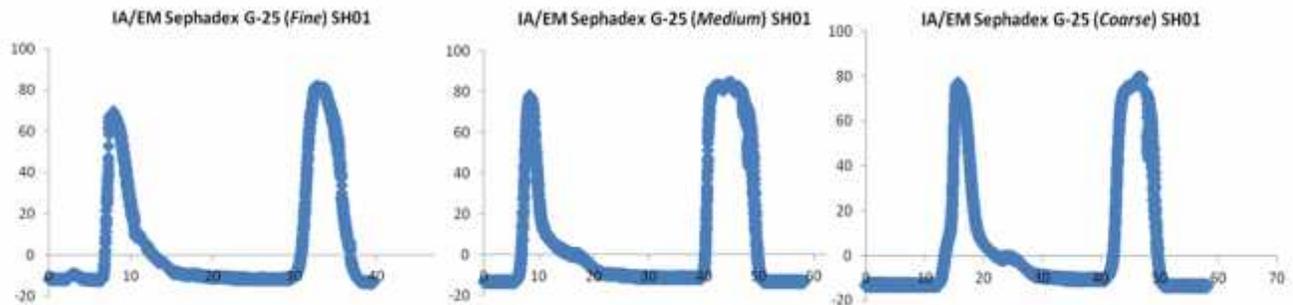


Figura 2. Cromatogramas obtenidos durante la purificación de las IgG del SH 01 mediante la cromatografía combinada de IO/EM. Se evaluaron tres calidades de la matriz de exclusión molecular *Sephadex G-25*: *Fine*, *Medium* y *Coarse* respectivamente con 1 mL de la matriz de intercambio aniónico DE-52. Pico 1: IgG purificada; pico 2: transferrina y pico 3 o lavado: proteínas del suero unidas a la matriz. La separación se realizó a un flujo de 0,5 mL/min en tampón K_2PO_4 (20 mM, pH 7,0).

Los cromatogramas obtenidos son muy parecidos al cromatograma tipo mostrado en la figura 1 B. Se puede apreciar un primer pico correspondiente a la elución de las IgG y un tercer pico donde eluyeron el resto de los factores solubles del plasma unidos a la matriz. Sin embargo, el pico 2 de la transferrina apenas se aprecia para la *Sephadex G-25 Fine* y se hace más marcado para las otras dos calidades. Por lo que las matrices de exclusión molecular pudieran estar influyendo en la resolución de esta cromatografía.

Luego del proceso de purificación se analizó la pureza de las IgG colectadas mediante electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida bajo condiciones reductoras. Para esto se evaluaron los SH 01 y 59, así como las fracciones de los tres picos 1 para cada calidad de *Sephadex G-25*. Se tomó como criterio de pureza la comparación del número de bandas de proteínas visibles en la fracción correspondiente a la IgG purificada, en adición a las bandas típicas de estos anticuerpos: 50 kDa para la cadena pesada y 25 kDa para la cadena ligera, por tratarse de un análisis en condiciones reductoras. Para definir la posición de las bandas correspondientes a la IgG se utilizó como control una preparación de IgG (41) purificada por cromatografía de afinidad por proteína A. Además se incluyó en el último carril un control de la proteína de suero transferrina previamente purificada.

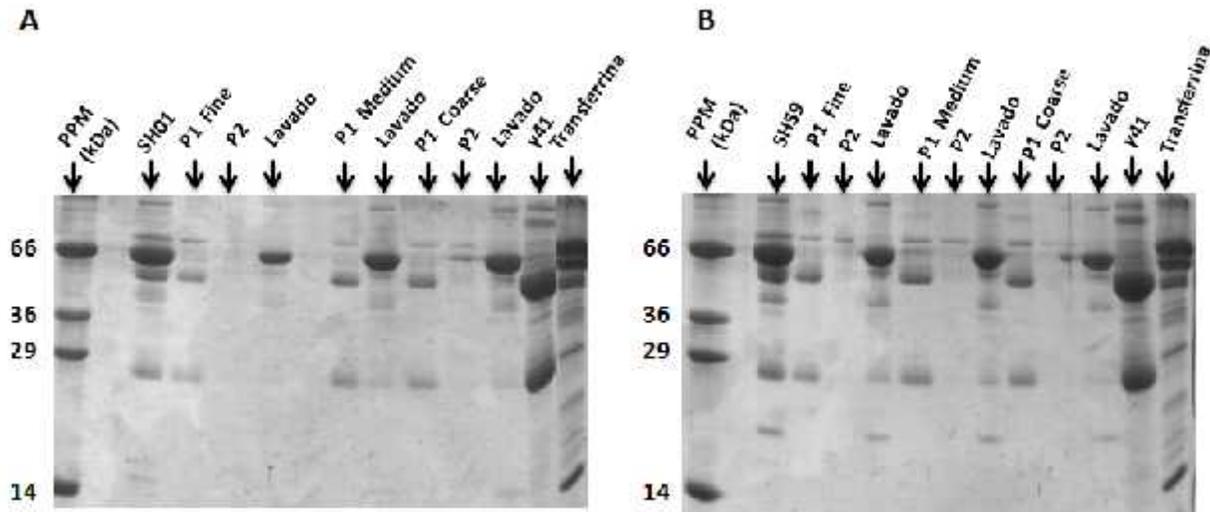


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras de los sueros y las fracciones obtenidas en los picos 1; 2 y 3 durante la purificación de IgG por cromatografía de IA/EM. A) SDS-PAGE al 12,5% para el SH 01 y B) SDS-PAGE al 12,5% para el SH 59. Se analizaron tres calidades de la matriz de *Sephadex G-25* (*Fine*, *Medium* y *Coarse*) (10 mL) con 1 mL de DE-52. Se aplicaron diluciones 1:100 de los SH y las fracciones de los picos colectados durante la purificación. P1: pico 1, P2: pico 2, PPM: patrón de peso molecular, 41: control de IgG, Transferrina: control de la proteína transferrina.

Como se puede apreciar, en los carriles P1 correspondientes a las IgG colectadas en la FNF para las matrices *Fine*, *Medium* y *Coarse* (figura 3A y 3B), se evidenció el perfil de bandas típico de estas inmunoglobulinas a nivel de los 25 y 50 kDa para ambos sueros analizados. Sin embargo, la aparición de una banda en estos carriles por encima de los 66 kDa evidenció una posible contaminación con otra proteína del suero humano. Al comparar la banda contaminante con el control de transferrina empleada en la corrida electroforética, se asoció la misma a la presencia de dicha proteína en la fracción de IgG. Se ha descrito que la transferrina constituye uno de los mayores contaminantes presentes en las preparaciones de anticuerpos purificados a partir de muestras de suero (Walker, 2002). No obstante, para este tipo de cromatografía dicha proteína tiende a eluir normalmente en el pico 2 del cromatograma muy cercana al pico de la IgG como se explicó con anterioridad (ver figura 1B), de ahí que ocurriera este tipo de contaminación. También se piensa que en los picos 2, además de la transferrina, pueden eluir algunas subclases de IgG menos básicas como la IgG2 e IgG4 humanas que se retrasan y no salen en el pico 1.

Por otra parte, para evaluar el posible impacto en análisis futuros de cierta pérdida de IgG en la FNF durante su purificación y que estaba presente en el suero de origen, se realizó una comparación de los títulos anti-DIIIIE y anti-VDEN respecto a los títulos obtenidos con el suero total correspondiente. Para el primer caso se utilizaron como antígenos los DIIIIE1 y DIIIIE4 recombinantes y como control negativo pozos recubiertos con BSA. Para el segundo, se empleó como antígenos una mezcla de los cuatro serotipos del VDEN

obtenidos del sobrenadante de células Huh 7.5 en ausencia de suero fetal bovino. Como control negativo se utilizó un sobrenadante de cultivo de las mismas células que se infectaron para obtener el antígeno viral. Tanto el título anti-DIIE como anti-VDEN se definió como la mayor dilución en la cual la señal de DO obtenida fue tres veces superior a la del control negativo.

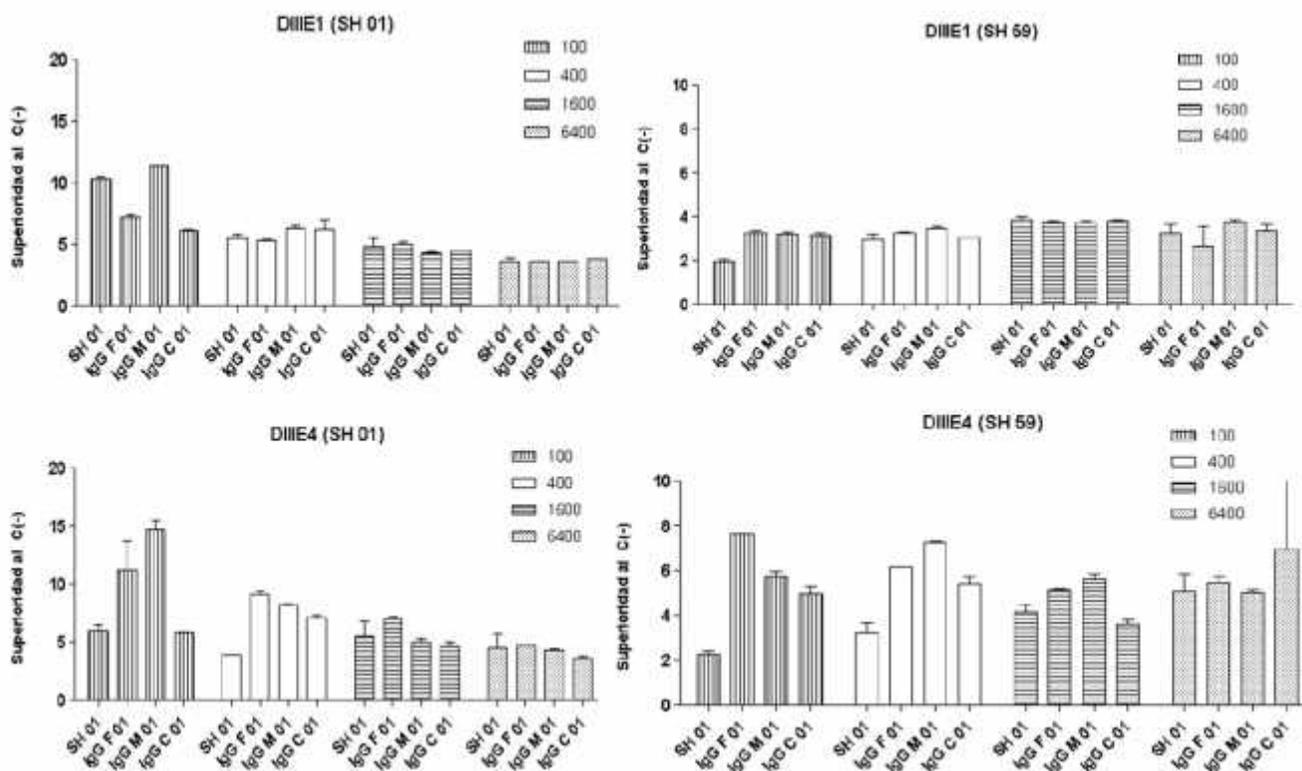


Figura 4. Comparación del título anti-DIIE de las IgG purificadas por cromatografía combinada IO/EM respecto al título en el suero de origen. Se emplearon como antígenos los DIIE1 (panel superior) y DIIE4 (panel inferior) frente a diluciones seriadas de los SH 01 y 59 y de sus correspondientes IgG purificadas con las matrices *Fine* (F), *Medium* (M) y *Coarse* (C) con 1 mL de la matriz DE-52. El título se definió como la mayor dilución para la cual se detectó una señal de DO al menos tres veces superior a la señal obtenida para el control negativo del ensayo.

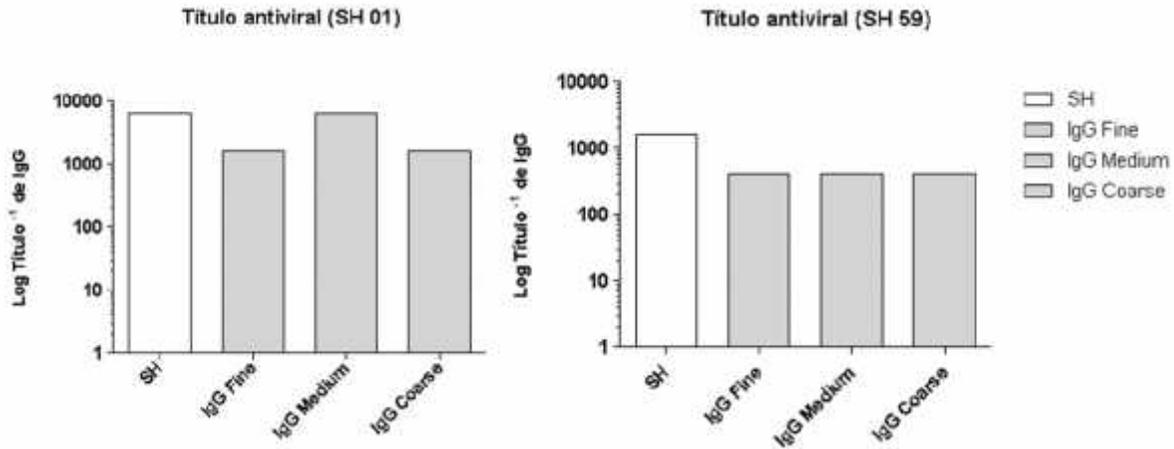


Figura 5. Comparación del título anti-VDEN de las IgG purificadas por cromatografía combinada IO/EM respecto al título del suero de origen. Se emplearon como antígenos los cuatro serotipos virales del VDEN frente a los SH 01 y 59 y sus respectivas fracciones de IgG purificadas con las matrices *Fine*, *Medium* y *Coarse* a 1mL de DE-52. El título se definió como la mayor dilución para la cual se detectó una señal de DO al menos tres veces superior a la señal obtenida para el control negativo del ensayo.

Al comparar la reactividad obtenida con los dominios III recombinantes analizados (ver figura 4) se observaron pequeñas diferencias en el reconocimiento de las IgG purificadas de los SH 01 y 59, específicamente en presencia del DIIIIE4. Se puede observar que, tanto las calidades *Fine* como *Medium* mostraron un mejor recobrado de la IgG anti-DIIIIE (1:100 y 1:400) respecto a la *Sephadex G-25 Coarse*. De igual forma se observó que para el título de anticuerpos anti-VDEN (ver figura 5) no se obtuvieron claras diferencias entre una matriz y otra, sin embargo, el recobrado de IgG purificada fue mayor para *Medium* en el caso del SH 01 respecto a *Fine* y *Coarse*.

A pesar que se esperaban diferencias en los resultados cromatográfico al tener en cuenta que el tamaño de las perlas hidratadas difiere para las tres resinas de *Sephadex G-25* evaluadas (ver tabla II) y por tanto el grado de compactación y empaquetamiento del gel, así como la distribución de las proteínas a través del mismo, no se observaron de manera obvia grandes diferencias en el recobrado de IgG y comportamiento de los perfiles cromatográfico obtenidos.

Al realizar una comparación entre los resultados de los perfiles cromatográfico y electroforético y en los títulos anti-DIIIIE y anti-VDEN para las tres calidades de la matriz *Sephadex G-25*, podemos decir que el empleo de las mismas en la exclusión molecular no constituye el paso determinante en la pureza y recuperación de las IgG en este tipo de cromatografía. Aun así, es válido aclarar que la matriz de exclusión molecular es importante durante el proceso de separación, puesto que pone a punto la entrada de las moléculas en la matriz de intercambio aniónico. Se retrasa así la llegada temprana a la misma de otras proteínas del plasma humano de menor talla molecular que pudieran contaminar la muestra de IgG que se desea purificar. Del mismo análisis se seleccionó

como matriz óptima de trabajo a la *Sephadex G-25 Medium* ya que presenta una resolución media respecto a *Fine* y *Coarse*, los resultados en cuanto recobrado y pureza según el perfil de bandas electroforéticas es muy semejante con las otras dos y se dispone de un volumen considerable de la misma para futuros ensayos.

Evaluación del efecto del volumen y calidad de la matriz de Intercambio Aniónico en la purificación de IgG humana

Otro de los parámetros que se tuvieron en cuenta para la optimización de esta cromatografía (IA/EM) fue el volumen de la matriz de intercambio iónico utilizada, así como el tipo o calidad de la misma. Como ya se comentó en el resultado anteriormente discutido, aparentemente este será el paso determinante para una mejor pureza y recobrado de las IgG.

En este ensayo se decidió evaluar dos tipos de matrices de intercambio aniónico: (DEAE-celulosa) DE-52 (Whatman BioSystem, Inglaterra) y DEAE *Sepharose*TM *Fast Flow* (GE Healthcare). Las mismas varían en la composición del polímero que forma el entramado, pero mantienen constante el grupo funcional del intercambiador: dietilaminoetanol (DEAE) el cual permite la separación de las moléculas de acuerdo a la carga superficial de las mismas.

De manera general columnas de 10 cm se empaquetaron con 1, 2 y 3 mL de cada resina de intercambio aniónico a evaluar y se completaron con 10, 9 y 8 mL de la matriz *Sephadex G-25 Medium* respectivamente. Se equilibraron en tampón fosfato (20 mM, pH 7,0) y para la corrida cromatográfica se realizó una dilución 1:2 de 125 μ L del SH 51 en el tampón de trabajo. Las IgG se colectaron en la FNF, correspondiente al pico 1 del cromatograma.

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos durante la purificación de las IgG del SH 51 a partir de volúmenes variables de las matrices de intercambio aniónico DE-52 y DEAE *Sepharose*.

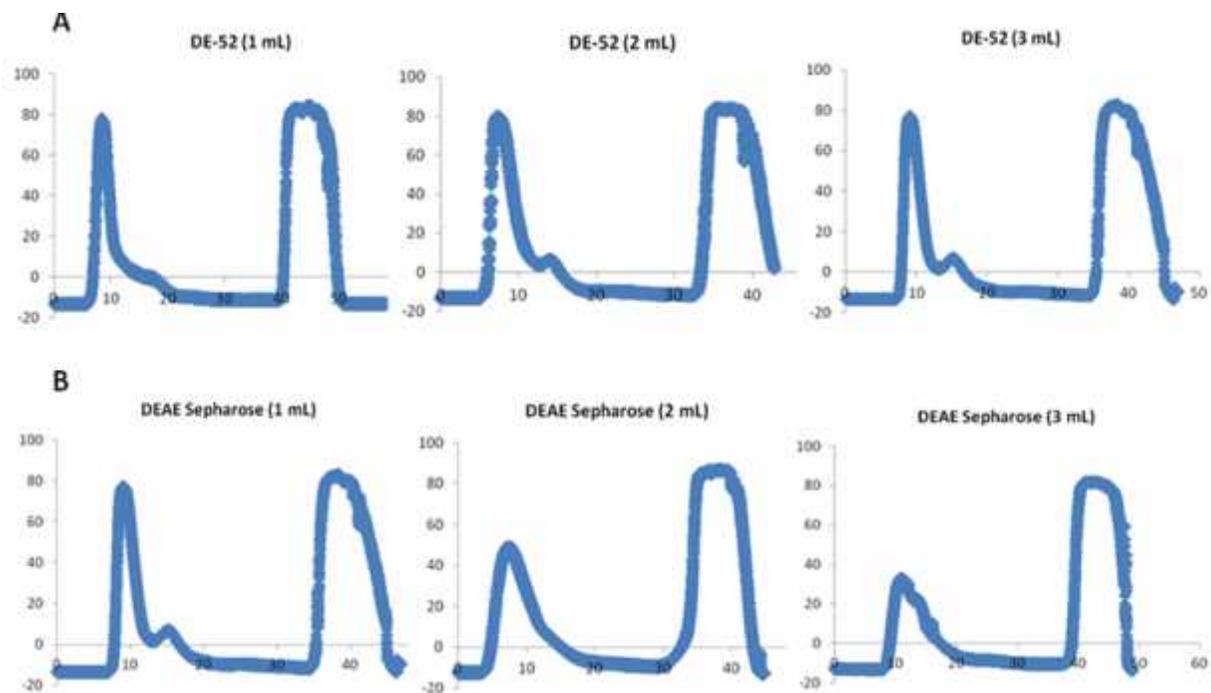


Figura 6. Cromatograma obtenidos durante la purificación de las IgG a partir del SH 51 en una cromatografía combinada IA/EM. A) Cromatograma correspondientes a 1; 2 y 3 mL de la matriz de intercambio aniónico DE-52 respectivamente con la matriz de exclusión molecular *Sephadex G-25 Medium*. **B)** Cromatograma correspondientes a 1; 2 y 3 mL de la matriz de intercambio aniónico DEAE *Sepharose* respectivamente con la matriz de exclusión molecular *Sephadex G-25 Medium*. Pico 1: IgG, pico 2: transferrina y pico 3 o lavado: proteínas del suero unidas a la matriz. La separación se realizó a un flujo de 0,5 mL/min en tampón K_2PO_4 (20 mM, pH 7,0).

De los mismos se puede apreciar que para la matriz DE-52 a medida que aumenta su volumen en la columna, aumenta el poder de resolución y se distingue mucho mejor el pico 1 del pico 2. Este resultado fue de suma importancia ya que facilitó la purificación de las IgG y ayuda potencialmente a reducir la posibilidad de contaminación con transferrina. Parece ser que la matriz de intercambio iónico es quien puede determinar la purificación de las IgG, si se tiene en cuenta el punto isoeléctrico de los anticuerpos y del resto de las proteínas del suero, cuyas cargas superficiales pueden ajustarse al tipo de intercambiador variando el pH del tapón de trabajo. Contrario a los resultados observados para la matriz DE-52, el aumento del volumen de DEAE *Sepharose* no benefició el proceso de purificación, en cambio, hay una gran pérdida de la resolución. Para este caso, la disminución de la resolución puede deberse a una disminución del volumen de la matriz *Sephadex G-25 Medium* a medida que aumenta el de DEAE *Sepharose*. Mientras mayor sea el tamaño de la matriz de exclusión molecular en la columna, más tiempo tendrán las proteínas del suero para separarse y más distantes eluirán las IgG de la transferrina y aumentará así la resolución de los picos.

De igual forma que en el acápite anterior, la pureza de las fracciones de IgG se analizó mediante electroforesis (SDS-PAGE) en gel de poliacrilamida bajo condiciones reductoras. Los perfiles electroforéticos obtenidos se muestran a continuación.

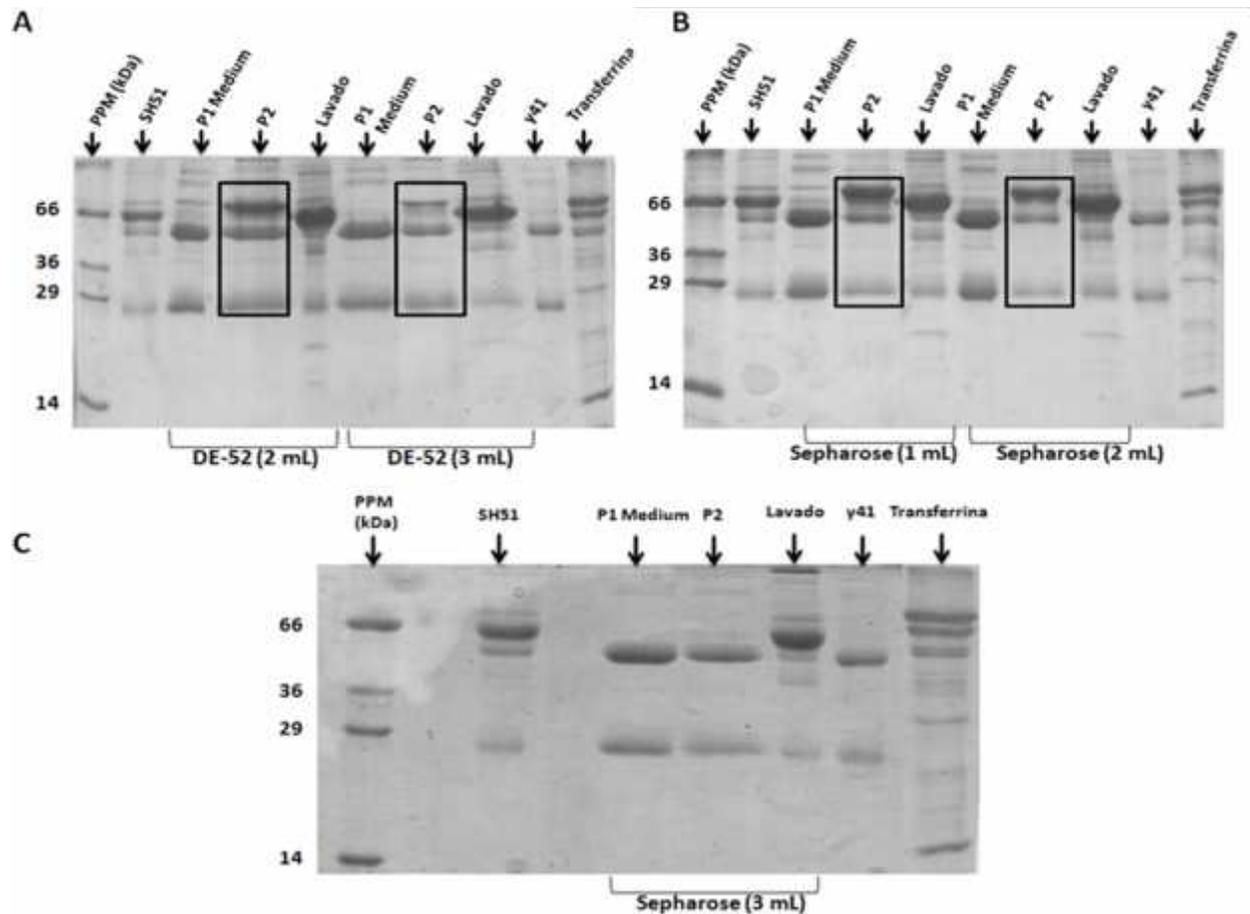


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras de las fracciones obtenidas en los picos 1; 2 y 3 durante la purificación de IgG por cromatografía de IA/EM en presencia de dos tipos de matrices de intercambio aniónico. A) SDS-PAGE al 12,5% para 2 y 3 mL de la matriz DE-52, B) SDS-PAGE al 12,5% para 1 y 2 mL de la matriz DEAE Sepharose y C) SDS-PAGE al 12,5% para 3 mL de la matriz DEAE Sepharose. Se aplicó una dilución 1:100 del SH 51 y de las fracciones de los picos colectados durante la purificación. P1: pico 1, P2: pico 2, PPM: patrón de peso molecular, 41: control de IgG, Transferrina: control de la proteína transferrina.

En los picos 1, donde se colectaron las IgG purificadas con las matrices DE-52 y DEAE Sepharose (evaluadas a diferentes volúmenes), se distinguen las bandas características de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas G (50 y 25 kDa respectivamente) al comparar con el control positivo de IgG 41. Por otra parte, se evidenció cierta pérdida de IgG de la FNF hacia el pico 2 durante la purificación, la cual se mantuvo presente en todas las condiciones evaluadas. Esto pudo deberse a una baja resolución de los picos, principalmente al utilizar la matriz DEAE Sepharose donde parece ser que la pérdida de

resolución está relacionada con el aumento del volumen del intercambiador y por tanto de una disminución del de exclusión molecular. Ya se conoce que la matriz *Sephadex G-25 Medium* pone a punto la entrada de las proteínas en la matriz de intercambio y al reducir su volumen, a expensas de aumentar el de DEAE *Sepharose*, se está acortando la distancia requerida para que las moléculas se separen lo suficiente y no entren juntas en la matriz de intercambio iónico. Como no existe una buena resolución, se deja de colectar una parte de las IgG en la FNF para evitar que al final del pico 1 exista una contaminación con transferrina donde se pone en evidencia una relación costo-beneficio. Este hecho justifica la presencia de IgG en el pico 2. Sin embargo, el aumento del volumen de la matriz DE-52 con la consecuente disminución del de *Sephadex G-25 Medium* no afectó la resolución, todo lo contrario, aumenta. Quizás esto permitió, si se analiza la intensidad de las bandas para 3mL de DE-52, cierta recuperación de las IgG del pico 2 hacia al pico 1 la cual aparenta ser mayor respecto a DE-52 2mL. También es válido destacar que al aumentar el volumen de ambas matriz de intercambio aniónico, se logra separar gran parte de la transferrina al pico 2, que constituyó un contaminante inicial en la muestra de IgG purificada.

Por otra parte, el cálculo de la concentración de las IgG en suero a partir de las preparaciones purificadas se utilizó como una medida del comportamiento global en la recuperación de IgG a partir de la separación cromatográfica. Para deducir la concentración se realizó una corrección donde se tuvo en cuenta el volumen colectado para cada fracción de IgG y el volumen inicial de la muestra de suero procesada.

Tabla III. Concentración de IgG obtenidas en las FNF durante la purificación de varios sueros mediante cromatografía combinada IA/EM

IgG p (F SH 01)	16.191	IgG p (F SH 59)	16.09533	DE-52 2 mL	17.58067	Seph 2 mL	9.059
IgG p (M SH 01)	16.346	IgG p (M SH 59)	18.984	DE-52 3 mL	16.3791	Seph 3 mL	6.570667
IgG p (C SH 01)	14.166	IgG p (C SH 59)	16.688	Seph 1 mL	16.376		

*F (*Fine*) M (*Medium*) C (*Coarse*)

En esta tabla III se observa que la mayoría de las muestras de IgG obtenidas para los tres sueros estudiados en las distintas condiciones evaluadas, mostraron concentraciones similares a los valores informados en la literatura en cuanto a los niveles de IgG circulante en el suero de personas sanas, que oscilan entre 8-16 mg/mL (Devlin, 2004). Sin embargo, para las fracciones de IgG cuantificadas para DEAE *Sepharose* 2 y 3 mL se observó pérdida de la IgG total, lo cual confirma que la baja resolución obtenida para la misma condujo a perder cierta parte de las IgG en el pico 1 con el fin de que no se contaminaran con transferrina. Los valores casi idénticos de las concentraciones de IgG purificadas empleando las tres calidades de *Sephadex G-25* con un ligero aumento hacia *Medium*, demuestran nuevamente que no existen diferencias marcadas entre ellas en cuanto al recobrado. También, la concentración de IgG obtenida con DE-52 (3 mL) es superior a la obtenida por DE-52 (2 mL), lo cual tiene sentido si se tiene en cuenta la mejoría de la resolución al aumentar su volumen. Por lo contrario, con la matriz DEAE *Sepharose* (1 mL,

2 mL y 3mL) se perdió parte de las IgG en la FNF en ese mismo orden a la vez que también se perdía resolución de los picos en el cromatograma. Si se analiza la recuperación de IgG entre DE-52 y DEAE *Sepharose* hasta el momento, la primera es sumamente factible tanto cualitativa como cuantitativamente en la recuperación de IgG durante la purificación.

No obstante se comparó la reactividad anti-VDEN mediante un ELISA indirecto de captura de virus, tanto para el SH 51 como para las fracciones de IgG obtenidas con 1 y 2 mL de DE-52 y 1; 2 y 3 mL de DEAE *Sepharose*, con el objetivo de conocer el posible impacto de las pérdidas de IgG para ensayos posteriores.

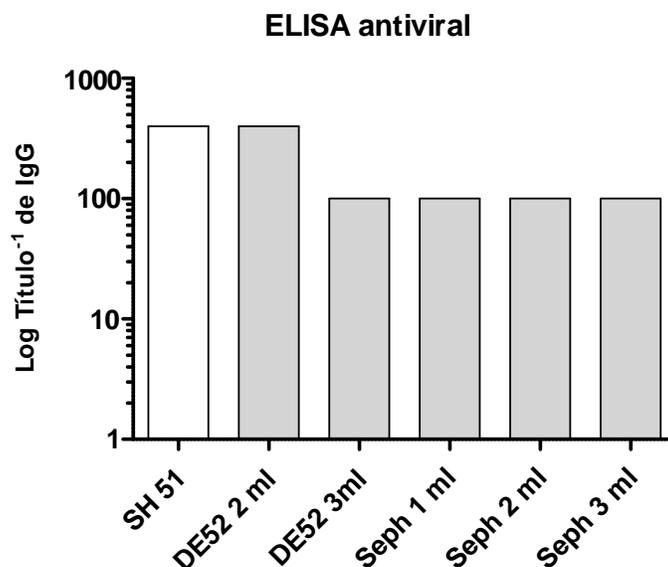


Figura 8. Título anti-VDEN del SH 51 y sus IgG purificadas por cromatografía combinada IO/EM con las matrices de IO DE-52 y DEAE *Sepharose*. Se emplearon como antígeno los cuatro serotipos virales del VDEN. El título se definió como la mayor dilución para la cual se detectó una señal de DO al menos tres veces superior a la señal obtenida para el control negativo del ensayo.

Del ELISA anti-VDEN con el SH 51 y sus IgG purificadas, se aprecia que el título para DE-52 (2 mL) fue mayor mientras que, para el resto de las resinas la respuesta de IgG anti-VDEN se mantuvo prácticamente invariable. Este resultado tiene mucho sentido si se tiene en cuenta que para dicha matriz se obtuvo un buen recobrado de IgG.

A pesar que ambas matrices de intercambio aniónico tienen el mismo grupo funcional (DEAE) y solo difieren en el tipo de polímero del que están compuestas, los resultados en la purificación de IgG son diferentes. Se piensa que el polímero de la matriz DE-52 en presencia del intercambiador dietilaminoetanol determinó en cierta medida la efectividad de la cromatografía. Algunos factores intrínsecos de la matriz como el grado de entrecruzamiento y empaquetamiento, la estabilidad física y química de la misma, así como el tamaño de las perlas en el gel pudieron influir en el resultado final de esta purificación.

Se puede decir entonces, a grandes rasgos, que la matriz DE-52 (2 mL) combinada con *Sephadex G-25 Medium* ofrece muy buenos resultados en cuanto a la pureza y recobrado de inmunoglobulinas G a partir de sueros humanos inmunes a una infección por el VDEN.

Conclusiones

Durante el ensayo no se observaron diferencias marcadas en el grado de pureza y recobrado de las IgG para las tres calidades de *Sephadex G-25* comparadas. No obstante se seleccionó la calidad tipo *Medium* para el trabajo en el laboratorio. Además, la combinación de las matrices de intercambio aniónico y exclusión molecular (IA/EM) con las resinas DE-52 (2 mL)/*Sephadex G-25 Medium* respectivamente, mostró hasta el momento los resultados más prometedores para la purificación de IgG de muestras de sueros humanos inmunes a la infección por el VDEN.

Bibliografía

- BHATT, S. *The global distribution and burden of dengue*. Nature, 2013, 496, p. 504–507.
- CHEN, Y.; MAGUIRE, T.; MARKS, R.M. *Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells*. J Virol, 1996, 70, p. 8765–8772.
- CHIN, J.F.; CHU, J.J.; NG, M.L. *The envelope glycoprotein domain III of dengue virus serotypes 1 and 2 inhibit virus entry*. Microbes Infect, 2007, 9, p. 1–6.
- CHU, J.J.; RAJAMANONMANI, R.; LI, J.; BHUVANAKANTHAM, R.; LESCAR, J.; NG, M.L. *Inhibition of West Nile virus entry by using a recombinant domain III from the envelope glycoprotein*. J Gen Virol, 2005, 86, p. 405–412.
- DE ALWIS, R.; BELTRAMELLO, M.; MESSER, W.B.; SUKUPOLVI-PETTY, S.; WAHALA, W.M.; KRAUS, A.; OLIVAREZ, N.P.; PHAM, Q.; BRIAN, J.; TSAI, W.Y.; WANG, W.K.; HALSTEAD, S.; KLIKS, S.; DIAMOND, M.S.; BARIC, R.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO F.; DE SILVA A.M. *In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection*. PLoS Negl Trop Dis, 2011, 5(6), p. e1188.
- DEVLIN, T.M. *Bioquímica* (Cuarta edición), Reverté, Barcelona, 2004.
- GALÁN, J.F. *Dengue: ¿dónde nos encontramos en el desarrollo de una vacuna eficaz?* Mss, 2014, 4, p. 225-245.
- GUZMÁN, M.G.; ÁLVAREZ, A.; FUENTES, O.; KOURI, G. *Enfermedades de la pobreza, el caso del dengue*. Rev Anal Academ Cienc Cuba, 2012, 2(1), p. 1-22.
- HALSTEAD, S.B. *Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses*. Adv Virus Res, 2003, 60, p. 421-467.

HALSTEAD, S.B.; HEINZ, F.X.; BARRETT, A.D.; ROEHRIG, J.T. *Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27 June 2003, Vienna, Austria*. Vaccine, 2005, 23, p. 849-856.

KORAKA, P.; SUHARTI, C.; SETIATI, T.E.; MAIRUHU, A.T.A.; VAN GORP, E.; HACK, C.E.; JUFFRIE, M.; SUTARYO, J.; VAN DER MEER, G.M.; GROEN, J.; OSTERHAUS, A.D.M.E. *Kinetics of Dengue Virus-Specific Serum Immunoglobulin Classes and Subclasses Correlate with Clinical Outcome of Infection*. J. Clin. Microbiol, 2001, 39(12), p. 12 4332- 12 4338.

LAEMMLI, U.K. *Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. Nature, 1970, 227, p. 680-685.

MIDGLEY, C.M.; FLANAGAN, A.; TRAN, H.B.; DEJNIRATTISAI, W.; CHAWANSUNTATI, K.; JUMNAINSONG A.; WONGWIWAT W.; DUANGCHINDA T.; MONGKOLSAPAYA J.; GRIMES J.M.; SCRETON G.R. *Structural analysis of a dengue cross-reactive antibody complexed with envelope domain III reveals the molecular basis of cross-reactivity*. J Immunol, 2012, 188, p. 4971–4979.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S.C. *Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein*. J Virol, 2005, 79, p. 1223-1231.

ROEHRIG, J.T. *Antigenic structure of flavivirus proteins*. Adv Virus Res, 2003, 59, p. 141–175.

SUMAR, N.; BODMAN, K.; RADEMACHER, T.W. *Analysis of glycosylation changes using lectins*. J Immunol Meth, 1990, 131, p. 127-134.

TOLFVENSTAM, T.; LINDBLOM, A.; SCHREIBER, M.J.; LING, L.; CHOW, A.; OOI, E.E.; HIBBERD, M.L. *Characterization of early host responses in adults with dengue disease*. BMC Infect Dis, 2011, 11, p. 209.

WAHALA, W.M.P.B.; DE SILVA, A.M. *The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection*. Viruses, 2011, 3, p. 2374-2395.

WALKER, J.M. *The Protein Protocols Handbook* (Second edition), University of Hertfordshire, Hatfield, UK, 2002, p. 1079.