

Purificación de la proteína de 24 kDa del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo1 a partir de una nueva formulación del antígeno inactivado

Anitza Fragas-Quintero, Dervel Felipe Díaz-Herrera, Enrique Noa-Romero, Otto Cruz-Sui, Manuel Frías-Abreu, Eladio Silva-Cabrera.

Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA). Carretera de Jamaica y Autopista Nacional. Mayabeque, Cuba. cicdc@infomed.sld.cu feloany@infomed.sld.cu.

Recibido: 26 de agosto de 2015. Aceptado: 27 de noviembre de 2015.

Palabras clave: Proteína 24 del VIH-1, purificación, cromatografía de inmunoafinidad, inmunización.

Key words: HIV-1 p24 protein, purification, affinity chromatography, immunization.

RESUMEN. La proteína de 24 kDa del VIH-1 constituye una de las principales moléculas en el diagnóstico de la infección en estadios tempranos, además, se utiliza como marcador de progresión en la infección por VIH y para evaluar la eficacia de la terapia antirretroviral. Esta proteína se obtiene al purificar antígenos naturales del VIH-1 por cromatografía de inmunoafinidad. El procedimiento para su purificación no ha variado; sin embargo se han realizado cambios en el proceso de obtención de los antígenos. El objetivo de este trabajo fue demostrar que el nuevo procedimiento de obtención de antígenos naturales del VIH-1, no afectó la actividad biológica de la proteína purificada. La pureza de la proteína purificada se determinó por electroforesis seguida de tinción con nitrato de plata. Se empleó un patrón de peso molecular y un patrón de proteínas del VIH-1, para estimar su peso molecular. Para la caracterización inmunogénica de la proteína purificada, esta se inoculó en conejos y el suero obtenido se analizó por ELISA. La antigenicidad se confirmó por Western blot, el cual se reveló inmunológicamente con un suero positivo al VIH-1. La tinción con nitrato de plata mostró bandas en los 55 kDa y en los 24 kDa. El peso molecular fue de 24 kDa. La titulación de los sueros de conejo por ELISA reportó títulos hasta 1:1250. El ensayo de Western blot reveló fuerte reactividad a dos proteínas correspondientes a la p55 y p24 del VIH-1. El proceso de purificación permitió contar con una proteína activa, donde no se afectó la actividad biológica de la p24 purificada, a pesar de los cambios introducidos en el proceso de obtención del antígeno inactivado de VIH-1.

ABSTRACT. The 24 kDa protein of HIV-1 is one of the major molecules in the diagnosis of early stage infection also is used as a marker for progression in HIV infection and for evaluating the effectiveness of antiretroviral therapy. This protein can be obtained by purifying HIV-1 natural antigens by immunoaffinity chromatography. The purification procedure has not changed; but changes have been made in the process of obtaining antigens. The aim of this work was to demonstrate that the new method for obtaining HIV-1 natural antigens did not affect the antigenic and immunogenic properties of the purified p24. Protein purity was determined by electrophoresis followed by silver staining. Molecular weight marker and pattern of HIV-1 protein was used to estimate molecular weight of purified protein, by measuring the relative mobility. For immunogenic characterization of purified protein, rabbits were inoculated with the purified product and the obtained serum was analyzed by ELISA. Antigenicity is confirmed by Western blot analysis, which revealed immunologically with a positive serum of HIV-1. Silver staining showed bands at 55 kDa and 24 kDa. The molecular weight of purified protein was 24 kDa. Titration of rabbit serum by ELISA reached titles of 1: 1250. Western blot assay showed strong reactivity against two proteins corresponding to p55 and p24 of HIV-1. The purification process allowed to get an active protein, where in the antigenic and immunogenic properties of the purified p24 was not affected despite the changes in the process of obtaining HIV inactivated antigen.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), es la enfermedad que constituye el estadio final en la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).¹ La infección por VIH, provoca alteraciones biológicas que nos permiten detectar la presencia directa del virus o los cambios en el hospedero como respuesta a la infección. En muchas ocasiones se detecta indirectamente a través de la detección de los anticuerpos contra el VIH. Las pruebas de laboratorio para identificar la infección por VIH se emplean desde hace más de 20 años en todo el mundo y en la actualidad son un factor primordial en el control de la epidemia y en la lucha contra la enfermedad.^{2,3}

Las técnicas para el diagnóstico de los principales indicadores incluyen: la determinación de anticuerpos contra el virus en el suero u otros fluidos corporales, el aislamiento viral, medición de proteínas antigénicas circulantes y los métodos moleculares altamente sensibles que son capaces de identificar la infección temprana.⁴⁻⁶

Los marcadores virales y del huésped que aparecen durante la infección con VIH se utilizan para el diagnóstico, el monitoreo de la replicación viral, la progresión de la enfermedad y el estado inmune. Estos varían en dependencia de la dinámica viral y la cinética de la respuesta inmune del hospedero.^{6,7}

Una de las características que distingue al VIH es la alta tasa de replicación viral; se estima que 10^{10} partículas virales se producen por día en el proceso infeccioso y alrededor de 10^7 viriones por mililitro de sangre en el período de viremia. Esta habilidad que presenta el virus provoca que el tiempo de vida media infectiva en la célula sea eficiente, con una constante producción de partículas virales a nivel celular. De esto se deriva la importancia de conocer la estructura de las moléculas que intervienen en el ensamblaje del virus a la célula y de las que siguen una cinética específica con valor pronóstico de la infección.^{8,9}

La proteína de 24 kDa del VIH-1 (p24) aparece cerca del día 16 después de la infección como resultado de la ruptura de la proteína precursora p55 en la etapa inicial de la replicación viral donde se escinde en p24, p17 y p7. Estas proteínas son esenciales en el ciclo viral del VIH desde el punto de vista estructural y funcional. Ellas coordinan el reemplazo viral, unión a la membrana, ensamblaje, además de cofactor para el empaque, liberación y modulación viral; marcando el curso en la maduración viral imprescindible en el ciclo de vida del virus.⁸

La p24 puede detectarse más precozmente que los anticuerpos (Ac) en la sangre durante la infección aguda. Por lo tanto, este marcador puede utilizarse para la detección temprana de la infección ya que se acorta el período de ventana alrededor de una semana.²

Laboratorios DAVIH (Mayabeque, Cuba) produce un sistema inmunoenzimático tipo sandwich de detección de la p24 (*DAVIH-AgP24*) que puede cuantificar niveles de concentración de p24 entre 514 -16 pg/mL en muestras de suero, plasma o sobrenadante de cultivos virales. Uno de los reactivos biológicos necesarios para el desarrollo de dicho estuche es la proteína de 24 kDa del VIH-1, que se emplea como reactivo control del sistema y como producto intermedio para la purificación de anticuerpos policlonales humanos-específicos a la p24 conjugados con peroxidasa de rábano picante para la detección de la unión antígeno-anticuerpo.¹⁰

La fuente para la obtención de la p24 lo constituye el antígeno natural inactivado de VIH-1, el cual se purifica por cromatografía de inmunoafinidad, técnica capaz de separar cualquier biomolécula sobre la base de su función biológica o de su estructura química individual.^{11,12} En la mejora continua del proceso de obtención del antígeno se han ajustado diferentes parámetros del cultivo y purificación del virus, que han arrojado en un incremento en la producción de partículas virales.¹³ Aunque esta técnica cromatográfica permite el trabajo con volúmenes grandes de material biológico debido a su efecto concentrador y se obtienen altos recobrados del material purificado y la desorción selectiva permite obtener la sustancia en forma activa, se desconocía entonces, el efecto de estos nuevos ajustes sobre la actividad biológica de la p24. El objetivo de este trabajo fue demostrar que los cambios introducidos en el proceso de obtención del antígeno natural del VIH-1, no afectaron las características antigénicas e inmunogénicas de la p24 purificada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de antígeno inactivado de VIH-1

Las células CEM-CCRF clon 17 se inocularon con la cepa de VIH-1 BRU a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 y se sembraron a 5×10^5 células/mL en frascos Roller en medio RPMI-1640 (GIBCO, Golthersbur, MD, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (HYCLONE Roadlogan, Utah, USA), 1 % de L-glutamina (SIGMA, St Louis, Mo, USA), 5 μ g/mL de Polibrene (SIGMA, St Louis, Mo, USA) y 40 μ g/mL de gentamicina (GIBCO, Golthersbur, MD, USA). Los cultivos se incubaron a 37 °C en incubadora (WHEATON). El día de máximo efecto citopático (ECP), el sobrenadante de cultivo se aclaró por centrifugación diferencial y se concentró con PEG-6000 (BDH, Limited Poole, England) al 10 % durante 20 h a 4 °C. El virus se purificó por gradiente discontinuo de sacarosa de concentraciones 20 % - 35 % - 50 % a 28 000 r/min (100 000 x g) durante 60 min a 4 °C. Se eliminó la fracción correspondiente a la muestra del concentrado viral y se colectó la fase correspondiente a las concentraciones de sacarosa desde el 20 % hasta la banda que se observó en la sacarosa al 50 % y se diluyó en disolución de NTE (NaCl 0,1 mol/L Tris 0,02 mol/L y EDTA 1mmol/L) con 2 mM de PMSF (Calbiochem, San Diego, CA, USA) pH 8,5.

El virus se precipitó a 45 000 r/min (165 000 x g) durante 30 min a 4 °C. El precipitado viral se inactivó con Tritón X - 100 (MERCK KGaA, Darmstadt, Germany) al 1 % preparado en disolución de NTE- PMSF.¹³

Proceso de purificación de la proteína de 24 kDa del VIH-1

El proceso de purificación de la p24, a partir del antígeno inactivado del VIH-1, consta de dos etapas, una cromatografía de inmunoafinidad en AcM-Sefarosa (Laboratorios DAVIH, Mayabeque, Cuba) y una diálisis posterior en disolución salina al 0,9 % para estabilizar el pH y la fuerza iónica del producto purificado. Para el proceso de purificación se utilizó un sistema de purificación de baja presión (BROMMA-LKB, Sweden).^{11,12}

La estimación de la concentración de proteínas se realizó por medición de la densidad óptica (D.O) a 280 nm en espectrofotómetro (GENESYS 10S UV-VIS, Madison, WI USA).¹² Para realizar los cálculos nos basamos en la siguiente fórmula:

$$C_{p24} = 10 \times D.O_{280} \times f_d / (\epsilon \times I)$$

donde:

C_{p24} : concentración de p24 (mg/mL).

$D.O_{280}$: lectura de densidad óptica de la muestra a 280 nm en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

ϵ : coeficiente de extinción porcentual de la p24 (1) dado para una disolución de p24 al 1 %, 1 cm de paso de luz y una longitud de onda de 280 nm.

I: paso de luz en cm.

f_d : factor de dilución.

Criterio de pureza y determinación del peso molecular de la proteína purificada

La pureza de la proteína y el peso molecular (PM) de la misma se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 % en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).^{14,15} Para ello se utilizó un patrón de peso molecular de amplio espectro (SIGMA Marker M-4038, St Louis, Mo, USA)¹⁶ y un patrón de proteínas del VIH-1. El revelado de la proteína en el gel fue mediante tinción con nitrato de plata.^{15,17} Se calcularon las movilidades relativas (Rf) de las proteínas patrones de peso molecular y de la proteína purificada, mediante la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la proteína desde el origen}}{\text{Distancia desde el origen hasta el frente de corrida}}$$

La curva de calibración se seleccionó tomando como eje de las abscisas los valores de Rf de las proteínas patrones del estuche de calibración y en el eje de las ordenadas, los logaritmos de sus pesos moleculares. Se halló la recta de mejor ajuste por un análisis de regresión lineal y el PM de la p24 se estimó por interpolación de los valores de Rf en la curva de calibración.^{16,18}

Determinación de la actividad biológica

Caracterización inmunogénica de la proteína purificada

1. Esquema de inmunización en conejos

Para la caracterización inmunogénica de la proteína purificada, se inmunizaron conejos F1 (híbrido) hembras de 2 a 3 kg de peso. El día cero del esquema de inmunización, se inoculó a cada conejo una concentración de 150 µg/mL de la p24 en solución salina al 0,9 % con adyuvante completo de Freund (SIGMA, St Louis, Mo, USA) en una proporción 1:1 (V/V) para un volumen total de 1 mL por animal. La inoculación fue por vía subcutánea en la región dorsal, a ambos lados de la cadena ganglionar de cada animal. En los días 15 y 30 del esquema de inmunización, se preparó un segundo inóculo con adyuvante incompleto de Freund (SIGMA, St Louis, Mo, USA) a razón de 150 µg/mL de la p24, de la misma forma que el inóculo anterior y se inoculó también por vía subcutánea en la región dorsal, a ambos lados de la cadena ganglionar tomando cuidado de no repetir en el mismo sitio de la primera inoculación. A los 40 d se reinmunizaron los animales por vía intravenosa con 0,5 mL de p24 a una concentración de 133,3 µg/mL. A los 10 d de la última inoculación, los conejos fueron sacrificados, las muestras de sangre fueron colectadas y se incubaron a 37 °C por dos horas y a 4 °C de 16 a 20 h. Posteriormente se extrajo el suero por centrifugación a 4 000 r/min (1000 x g) en centrífuga (EPPENDORF, Hamburg, Germany) por 10 min.¹⁹ Las muestras de suero se analizaron por un sistema ELISA de detección de anticuerpos a la p24 del VIH-1.

2. Sistema ELISA para la detección de anticuerpos contra la proteína de 24 kDa del VIH-1

El principio del método se basó en un ELISA de inhibición donde se emplearon placas de poliestireno (MAXISORP F16, Roskilde, Denmark) sensibilizadas con anticuerpos monoclonales de origen murino anti p24 del VIH-1 a razón de 10 µg/mL. Los sueros de conejo objeto de estudio se incubaron una hora a 37 °C conjuntamente con el antígeno (p24) a una concentración de 18 ng/mL. Se utilizaron anticuerpos policlonales específicos contra la p24 del VIH-1 conjugados con peroxidasa de rábano picante (Laboratorios DAVIH, Mayabeque, Cuba) en la detección, en una dilución de trabajo 1: 3000 y se incubó a 37 °C durante 30 min. El revelado del ensayo se realizó con la ortofenilendiamina (SIGMA, St Louis, Mo, USA) como reactivo cromógeno en una disolución sustrato Fosfato-Citrato pH 5 + Peróxido de Hidrógeno (Laboratorios DAVIH, Mayabeque, Cuba). La placa se incubó a temperatura ambiente en cámara oscura, durante 15 min y la reacción se paralizó con 100 µL de ácido sulfúrico 2 mol/L (MERCK KGaA, Darmstadt, Germany). La lectura se realizó a una longitud de onda de 492 nm en un lector de ELISA

(HUMAREADER HS, Wiesbaden, Germany). En todos los pasos del ensayo se lavó con disolución amortiguadora de sales pH 7,2 con Tween 20 (Laboratorios DAVIH, Mayabeque, Cuba) al 1,25 %.^{5,12}

Caracterización antigénica de la proteína purificada

La antigenicidad de la proteína purificada se confirmó mediante un ensayo de Western blot,^{14,15} el cual se reveló inmunológicamente con un suero positivo al VIH-1. En la corrida se incluyó un antígeno del VIH-1 como control para la identificación de esta proteína.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el nuevo proceso de obtención del antígeno natural de VIH-1 se logró optimizar las condiciones de cultivo desde las etapas de la obtención del sustrato celular y el inóculo viral, hasta las condiciones de inoculación, cosecha y purificación del antígeno viral que permitió una mayor producción de partículas virales. Las fracciones colectadas en el gradiente de sacarosa permitieron la precipitación de las proteínas libres como la p24 que no posee el mismo coeficiente de sedimentación que las partículas virales enteras, por tanto el antígeno viral resultó más enriquecido.¹³

El perfil cromatográfico del proceso de purificación de la p24 muestra el primer pico que corresponde a las proteínas presentes en el preparado antigénico que no interactúan con la matriz AcM-Sefarosa y que eluyen a pH 8,3. El segundo pico corresponde a las proteínas que interactúan con mayor fortaleza con la matriz, por lo que se requiere una elución más drástica a pH 2,8. (Fig.1)

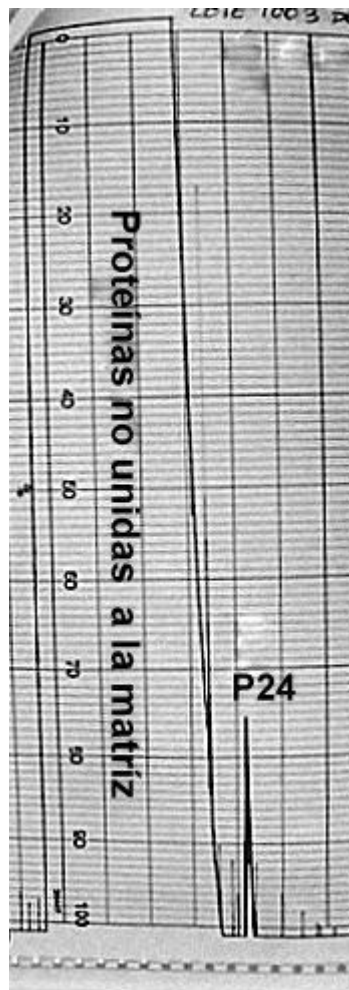


Fig.1. Perfil cromatográfico tipo obtenido de la purificación de la proteína de 24 kDa del VIH-1 por cromatografía de inmunoafinidad sobre Sefarosa - AcM anti p24.

Los recobrados de proteína purificada obtenidos fueron de 400 µg/mL, superiores a los obtenidos por Grana y col.¹¹ y Ruiz y col.¹² En este caso no es necesario obtener altas cantidades de p24 porque esta proteína se utiliza como componente de estuches de diagnóstico basados en la tecnología ELISA, que requieren pequeñas cantidades (pg y ng) de proteína. Estos valores de p24 son válidos también en sistemas de amplificación para la detección de p24 como es el caso de los sistemas de la Coulter y PerkinElmer donde el nivel de detección está en el orden de los fg/mL.²⁰ Los niveles de detección de p24 en estos sistemas se correlacionan con los valores obtenidos por las técnicas de Biología Molecular como la Carga Viral, esto es vital en el seguimiento de pacientes que reciben una terapia antirretroviral,

pues el monitoreo al tratamiento se puede hacer más periódico en aras de conocer cuan efectiva o no es la terapia y abaratar un poco los costos del diagnóstico y tratamiento del paciente, sobre todo para países en vías de desarrollo.¹⁰

Es evidente que los recobrados de proteína son mayores cuando se utilizan sistemas de expresión bacterianos pues el producto a purificar tiene como componente mayoritario la p24, a diferencia de cuando la proteína aislada proviene de fuentes naturales donde además de estar presente el resto de las proteínas del VIH-1, la concentración de p24 puede estar influenciada por no ser óptimas las condiciones de cultivo desde el punto de vista de sustrato celular, cepa viral y las condiciones de infectividad, cosecha y purificación del antígeno viral.^{18,21} Los valores obtenidos en cuanto a concentración de p24 no impidió el empleo posterior de la proteína purificada como inmunógeno para animales de laboratorio.

Uno de los métodos que más se utiliza para el análisis de la pureza de una proteína es la SDS-PAGE. Las posibilidades que brinda esta técnica son la separación de las proteínas por su tamaño molecular por lo que puede utilizarse para la caracterización molecular, la alta resolución, es barata y fácil de realizar y puede aplicarse en la mayoría de las proteínas. Además, permite que todas las proteínas adquieran la misma conformación y difieran solamente en el tamaño.^{14,15} La Figura 2 muestra los resultados de la SDS-PAGE al 10 % realizada para verificar la pureza de la p24 purificada. En la muestra correspondiente a la p24 se observaron bandas en los 55 kDa y en los 24 kDa al comparar con el patrón de peso molecular. Con respecto al patrón de VIH-1, la presencia de dos bandas proteicas de 55 kDa y 24 kDa, al mismo nivel de la p55 y p24 del VIH-1, confirma que estamos en presencia de la p24. La aparición en el producto purificado de una banda adicional de 55 kDa correspondiente con la p55 del VIH-1, no se considera una impureza del proceso de purificación ya que la p55 es una proteína cuya síntesis se encuentra codificada por el gen *gag* que durante el proceso de maduración viral se escinde en p24 y p17 por lo que comparte epítopes comunes con estas proteínas.^{8,21}

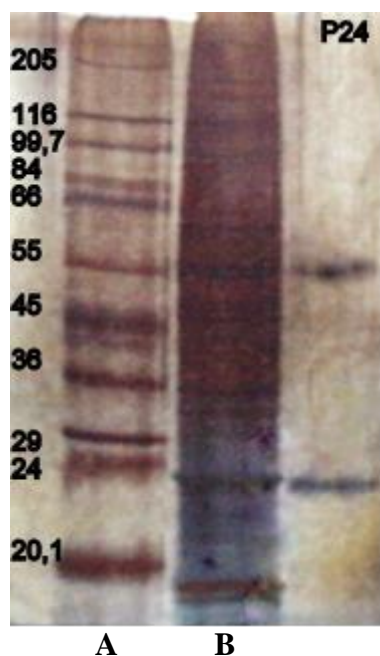


Fig. 2. SDS-PAGE revelado con nitrato de plata, realizada para evaluar la pureza de la proteína de 24 kDa del VIH-1.

A: Proteínas patrones de amplio espectro.

B: Patrón de PM del VIH-1.

P24: Proteína purificada.

La presencia de epítopes comunes en estas proteínas permiten ser reconocidas por anticuerpos monoclonales anti p24 utilizados en los procesos de purificación mediante cromatografía de inmunoafinidad.^{12,22} Adicionalmente para confirmar que la proteína revelada es la p24 se realizó el cálculo del PM a través del Rf. En la Figura 3, donde se grafica el logaritmo de sus pesos moleculares contra la distancia de migración de las proteínas patrones (Rf), se determinó que el peso molecular de la proteína purificada se encuentra alrededor de los 24 kDa. Estos resultados coincidieron con los reportados por Grana y col¹¹ y Ruiz y col¹², que al igual que nosotros utilizaron como fuente para la purificación de la p24 antígenos naturales inactivados y al emplear patrones de peso moleculares, definieron igual como 24 kDa el peso molecular de la proteína purificada. Zhang y col²¹ y Yeang y col,²³ por métodos biotecnológicos, insertaron en el genoma de la bacteria *Escherichia coli* la p24 para así obtener un producto por expresión bacteriana, con mayor rendimiento que el nuestro, pero con el mismo PM después de ser purificada.

En el estudio para la caracterización inmunogénica de la proteína purificada, la dilución de los sueros de conejo por ELISA reportó títulos de anticuerpos contra la p24 hasta 1:1250 luego de la última inoculación. El análisis por ELISA

indirecto demostró que la p24 purificada posee una adecuada inmunogenicidad al ser capaz de inducir una respuesta de anticuerpos específicos contra la p24 del VIH-1 en conejos. Esto es un resultado importante en nuestro estudio pues hasta el momento no se había logrado una respuesta de anticuerpos efectiva contra la p24 en animales de experimentación. Los sueros con altos títulos de p24 necesarios en la confección de los reactivos de detección de los diagnosticadores de Laboratorios DAVIH, Mayabeque, Cuba, se obtenían de donaciones de pacientes seropositivos vinculados al programa de VIH/sida; por lo que este resultado es una alternativa para la obtención de dicho componente en otra especie diferente al humano y así perfeccionar el desempeño de los mismos.

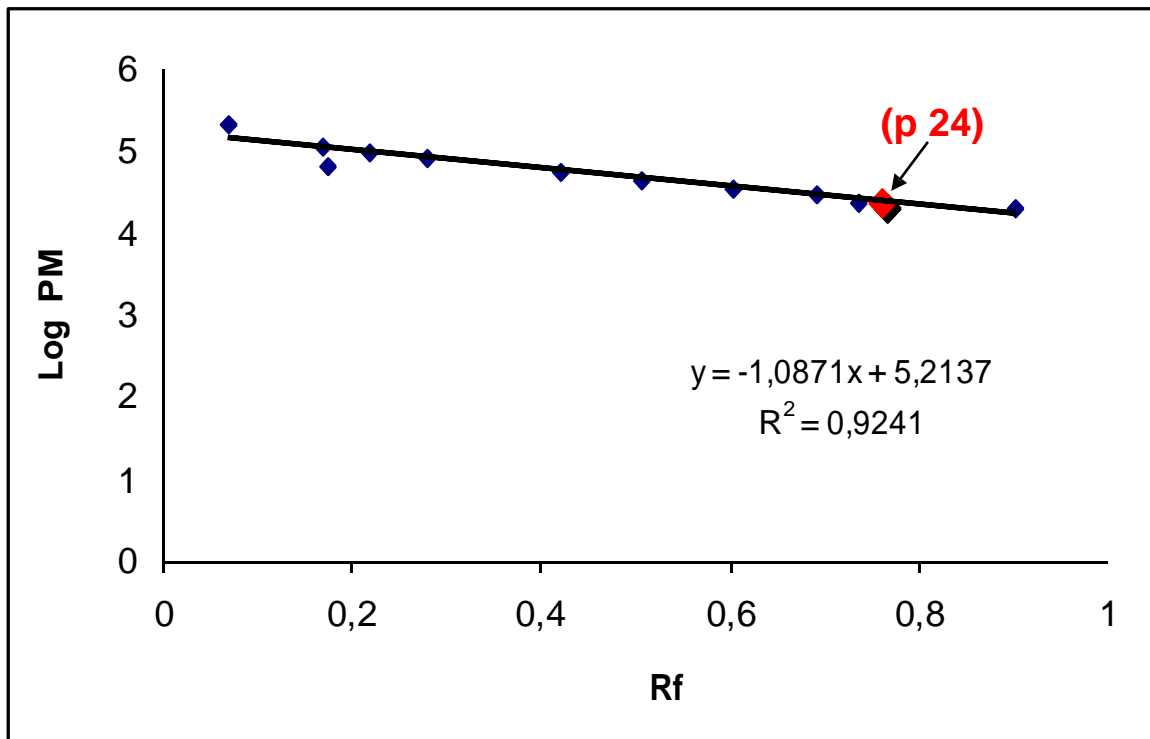


Fig. 3. Determinación del PM por cálculo del Rf de patrones de PM (SIGMA Marker), en gel teñido con nitrato de plata.

En la actualidad la tendencia en la producción de este tipo de componente es emplear inmunoglobulinas de especies diferentes al humano para aumentar la reproducibilidad y mejorar el desempeño de estos sistemas. La obtención de anticuerpos anti p24 con una elevada afinidad y especificidad es un prerrequisito indispensable para la obtención de conjugados anti p24 que se utilizan en los sistemas ELISA de 4ta generación y en sistemas de detección de antígeno p24.^{7,10}

El ensayo Western blot (Fig. 4) realizado a la proteína purificada para determinar la antigenicidad de la misma frente a un suero positivo a VIH-1 reveló, una fuerte reactividad contra una proteína, que al ser comparada con el patrón del antígeno de VIH-1 correspondió con la p24 natural. Además, se observó una ligera reactividad contra otra proteína de mayor peso molecular que coincidió con la p55 del patrón de VIH-1, que como se comentó anteriormente en la determinación de la pureza de la p24, este tipo de patrón es usual ya que la p55 es la proteína precursora de la p24. La inmunoreactividad de la proteína purificada no se afectó durante el proceso de purificación realizado, esto la hace valiosa para el desarrollo de medios de diagnóstico. La p24 purificada a partir de fuentes naturales mantiene una correcta conformación en su estructura terciaria y cuaternaria, de ahí que conserve sus características antigénicas.^{8,9,18}

Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores como Grana y col¹¹ y Ruiz y col¹² al observarse reactividad en la banda de 24 kDa y en menor medida en la de 55 kDa del producto purificado frente al suero positivo a VIH-1.

Actualmente la pandemia de sida constituye un grave problema para la salud mundial. Cerca de 35 millones de personas se han infectado con el VIH/sida. Alrededor de dos millones de personas se infectan con el virus cada año y la pandemia continúa con consecuencias devastadoras para la población mundial por más de tres décadas y aún no se logra comprender su patogenia.^{1,2}

Es de gran importancia entonces, poseer medios para realizar un diagnóstico temprano de la infección, así como para monitorear su progresión, con el objetivo de poder actuar sobre la misma. En la medida que los diagnosticadores sean más sensibles y específicos, mejor y más veraz será el diagnóstico. La calidad de los diagnosticadores depende en gran medida de la calidad de sus componentes vistos de manera individual. De ahí se deriva contar con metodologías para la obtención de esos biológicos y lograr un producto con la calidad requerida.

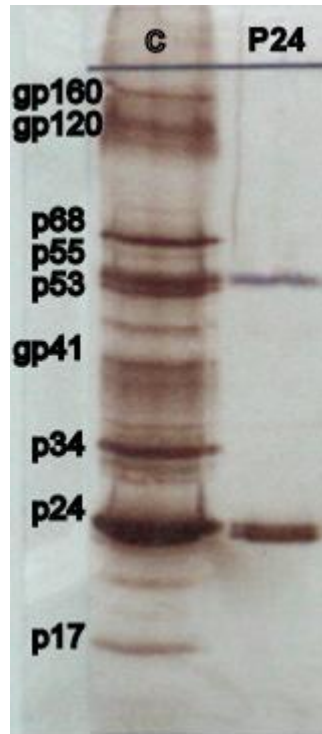


Fig. 4. Western blot de la proteína 24 del VIH-1 purificada, revelado con un suero positivo al VIH-1.
C: Antígeno de VIH-1.
P24: Proteína purificada.

Los ensayos realizados en cuanto a actividad biológica se refieren a la p24 purificada, demostraron, que los cambios introducidos en los procedimientos de obtención del antígeno inactivado del VIH-1 no afectaron las características antigénicas e inmunogénicas de esta proteína.

Se comprobó que la p24 purificada puede utilizarse para inducir respuesta específica de anticuerpos anti p24 en animales de experimentación y como antígeno para la detección de anticuerpos anti p24. Se logró obtener un producto biológico activo con la pureza y la calidad adecuada y así formar parte del diagnosticador *DAVIH-AgP24* empleado en el estudio del Síndrome de Retrovirosis Aguda asociado a la seroconversión, el seguimiento a largo plazo de individuos asintomáticos, estudios longitudinales de marcadores de progresión, la evaluación clínica de pacientes con conteos bajos de linfocitos CD4+, el pronóstico y manejo terapéutico de la infección por el VIH en edad pediátrica y el pronóstico y seguimiento de la infección perinatal por el VIH. También es importante la detección de la p24 en los sobrenadantes de cultivos del virus, ya que permite monitorear la replicación viral y cuantificar la concentración de esta proteína en los aislamientos del VIH.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cohen MS, Shaw GM, McMichel AJ, Haynes BF. Acute HIV-1 infection. *N Engl J Med.* 2011; 364: 1943-1954.
2. Branson M and Stekler J. Detection of acute HIV infection: We can't close the Window. Editorial commentary. *JID.* 2012; 205: 521-524.
3. Rosenberg NE, Kamanga G, Phiri S. Detection of acute HIV infection: a field evaluation of the determine HIV -1/2 Ag/ ab Combo test. *J Infect Dis.* 2011; 205: 528-534.
4. Masciotra S, McDougal JS, Feldman J, Sprinkle P, Wesolowski L, Owen SM. Evaluation of an alternative HIV diagnostic algorithm using specimens from seroconversion panels and persons with established HIV infections. *J Clin Virol.* 2011; 52: 17-22.
5. Díaz HM, Pérez MT, Lubián AL, Nibot C, Cruz O, Silva E, *et al.* Desempeño de la red de laboratorios para el diagnóstico de la infección por VIH en Cuba. *MedicRevista.* 2011; 13 (2): 9-13.
6. Wayne PA. CLSI. Criteria for laboratory testing and diagnosis of human immunodeficiency virus infection; approved guideline. CLSI document M53-A: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011.
7. Noé M, Ramos MS, Mercedes M, Rabinovich RD. Presence of p-24 Antigen associated to erythrocyte in HIV- positive individuals even in patients with undetectable plasma viral load. *Plos ONE.* 2011; 6 (1): 1-9. (www.plosone.org).
8. Lingappa JR, Reed JC, Tanaka M, Chutiraka K, Robinson BA. How HIV-1 Gag assembles in cells: Putting together pieces of the puzzle. 2014: 1-19.

9. Torrecilla E, Llácer T. New findings in cleavage sites variability across groups, subtypes and recombinants of human immunodeficiency virus type 1. *Plos ONE*. 2014; 9 (2): 1-11. (www.plosone.org).
10. Fragas A, Ortiz E, Díaz H M, Silva E, Izquierdo M. Perfeccionamiento del DAVIH-Ag P24 con el empleo del sistema de amplificación Biotina-Tiramina/Estreptavidina-Peroxidasa. Resultados preliminares. *Rev Cub Trop Med*. 2009; 61 (1): 13-19.
11. Grana R, Silva E, Ruiz N, Pérez MT. Purificación de la proteína de 24 kDa natural (p24) del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo-1 (VIH-1) utilizando inmunoafinidad. *Rev Cub Med Trop*. 1996; 48: 98-101.
12. Ruiz N, Álvarez G, Noa E. Procedimientos para la obtención de reactivos biológicos de los estuches DAVIH-AgP24 y DAVIH-AcP24. *VacciMonitor*. 2003; 6: 16-23.
13. Sánchez Y, Noa E, Cruz O, Díaz F, Lobaina L, Silva E, Dubed M, Montano L. Estudio y evaluación de antígenos de VIH-1 obtenido por encima de la banda en el segundo gradiente. Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil. N° Reg 588. 2007.
14. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*. 1979; 76: 4350-4.
15. Tsang VCW, Hanclock, Wilson M. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot technique (Western blot) for human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV) antibodies. U. S. Department of Health and Human Services Immunology Series publication no. 15.1985 CDC, Atlanta.
16. SIGMA Marker. Molecular weight standards, high, low and wide range. Catálogo M-4038. Sigma-Aldrich 2007-2008. Sigma, Product Information.
17. BIO-RAD Technical Bulletin 1089. The BIO-RAD Silver Stain. 2000.
18. Donayre-Torres A, Esquivel-Soto E, Gutierrez-Xicoténcatl L, Esquivel-Guadarrama F, Gómez-Lim M. Production and purification of immunologically active core protein P 24 from HIV-1 fused to ricin toxin B subunit in *E. coli*. *Virology Journal*. 2009; 6 (17): 1-11.
19. Cooper HM, Patterson Y. Production of Polyclonal Antisera. In: Wiley J & Sons, editors. *Current Protocols of Immunology*. Published online August 2008 in Wiley Interscience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/0471142735.im0204s82. Supplement 82: 2.4.1-2.4.10.
20. Huahuang D, Jianli L, Hong Z, Chin-Yih O, Wenge X, Maofeng Q, et al. Two types of nanoparticle-based bio-barcode amplification assays to detect HIV-p24 antigen. *Virology Journal*. 2012; 9 (180): 1-7.
21. Zhang B, Liu D, Bao Z, Chen B, Li C, Jiang H, et al. High level soluble expression, one-step purification and characterization of HIV-1 p24 protein. *Virology Journal*. 2011; 8 (316): 1-6.
22. Xenopoulos A. a new, integrated, continuous purification process template for monoclonal antibodies: Process modeling and cost of goods studies. *J Biotec*. 2015: 1-12.
23. Yeang ST, Siti AM, Tasyrig O, Chew YW, Narazah MY, Syed AA. Production and purification of polymerization competent HIV-1 capsid protein p24 (CA) in NiCo21 (DE 3) *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*. 2013; 13 (107): 1-14.