

INTERFERENCIA DE HEPARINA EN LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR EL MÉTODO DE BRADFORD

Heparin interference in the Bradford protein quantification assay

Laura M Cabanillas^{1*}, María A da Silva^{1*}, Anabella Marinsaldi^{1*}, María E Bernardi¹

¹Laboratorio de Hemoderivados; Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

*Estos autores contribuyeron equitativamente al desarrollo del trabajo.

✉ María Ángel da Silva: maria.dasilva@unc.edu.ar

Recibido: 18 de noviembre de 2022. Aprobado: 21 de junio de 2023

RESUMEN

La determinación de proteínas totales es una técnica de rutina utilizada en la industria biofarmacéutica durante los procesos de purificación de derivados plasmáticos y/o producción de proteínas recombinantes; y la elección del método analítico es un paso crítico para la obtención de resultados confiables. En este trabajo se demostró la interferencia de heparina (Hep), un compuesto comúnmente utilizado como excipiente en la formulación de Concentrados de Factores de la Coagulación (CFC), en la determinación de proteínas por el método de Bradford, cuya interferencia no está descripta como tal en los insertos de los kits comerciales de Bradford ni en la Farmacopea Europea. Esta interferencia fue demostrada tanto en soluciones de Albúmina Sérica Bovina (BSA) fortificadas con Hep, como en muestras de CFC. Para una solución de BSA 40 mg %, la concentración límite de Hep que no interfiere en la determinación de proteínas totales fue de 1,6 UI/ml. Cabe destacar que, si se trabaja a un nivel menor de concentración de proteínas, una proteína diferente o mezclas complejas de proteínas, se debe evaluar el grado de interferencia para cada caso particular, pudiéndose utilizar los valores obtenidos en este trabajo como referencia. Alternativamente, se evaluó la neutralización de la Hep con Polybrene (Poly), previo a la determinación de proteínas por Bradford. En el caso de soluciones de BSA, el efecto interferente se revirtió logrando una correcta cuantificación de proteínas, mientras que en las muestras de CFC, la neutralización con Poly no fue efectiva. Por lo tanto, para considerar el uso de Poly, previo a la aplicación del método de Bradford, debe evaluarse cada caso particular según las características de la muestra proteica en estudio. Si esto no es posible, se recomienda la utilización de un método alternativo, por ejemplo, el colorimétrico que utiliza ácido bicinconínico.

Palabras clave: Heparina, métodos analíticos, proteínas, factores de coagulación sanguínea.

ABSTRACT

Protein quantification in biological samples is a routine assay used in the biopharmaceutical industry during the purification procedures of plasma-derived products and/or recombinant proteins. Thus, choosing the method for this purpose is a critical step to obtaining reliable results. In this work, it was shown that Heparin (Hep), a compound commonly used as an excipient in the formulation step of Coagulation Factor Concentrates (CFC), interferes in protein quantification by the Bradford assay. This interference was proved both in solutions of Hep-fortified Bovine Serum Albumin (BSA) and in CFC samples. For a 40 mg % BSA solution, the Hep concentration which shows no interference in protein quantification is 1.6 IU/ml. It should be noted that a specific analysis must be carried out if working at a lower protein concentration, with a different protein, or with complex protein solutions, so the values obtained in this work can be used as a reference. Alternatively, Hep neutralization with Polybrene (Poly) was evaluated before protein determination by Bradford. In the case of BSA solutions, the interference was reversed and correct protein quantification was achieved, whereas in the CFC samples, the results were unsatisfactory. Until now, Hep interference in the Bradford assay has not been described in the scientific literature, nor listed in the inserts of the commercial kits for protein quantification by this method. It was concluded that for protein samples containing Hep, the choice of an alternative method, such as the one that uses bicinchoninic acid, is the most convenient option to obtain reliable results.

Keywords: Heparin, analytical methods, proteins, blood coagulation factors.

INTRODUCCIÓN

La cuantificación de proteínas totales (PT) en muestras biológicas es un procedimiento de rutina aplicado tanto en la industria biofarmacéutica como en el ámbito de la investigación científica. Entre las técnicas más utilizadas, se encuentran aquellas basadas en la habilidad intrínseca de las proteínas de absorber radiación ultravioleta (UV) y aquellas que utilizan colorantes o sondas que se unen a las moléculas proteicas, de manera que pueden ser detectadas por cambios colorimétricos o fluorométricos^[1,2]. Dentro de los métodos colorimétricos, el descrito por Marion Bradford en 1976 continúa siendo uno de los más utilizados dado que constituye un método rápido y fácil de ejecutar, de bajo costo y con sensibilidad satisfactoria^[3].

El método de Bradford, específico para proteínas, se basa en la formación de un complejo entre el colorante *Coomassie Blue G-250* (CBG) y las proteínas presentes en la solución. La forma catiónica del colorante, predominante en la solución ácida del reactivo de Bradford, tiene un máximo de absorbancia (Abs) a 470 nm (marrón rojizo). En contraste, la forma aniónica, involucrada en la formación del complejo con las moléculas proteicas, presenta un máximo de Abs a 595 nm (azul violáceo). La unión del colorante con las moléculas proteicas provoca la estabilización de la forma aniónica observándose el cambio metacromático característico en la solución (de marrón rojizo a azul violáceo). De esta manera, la cantidad de proteínas unidas al colorante (y, por lo tanto, la cantidad de proteínas presentes en la muestra) puede determinarse midiendo la Abs_{595nm}^[4].

Si bien aún no se ha dilucidado el mecanismo exacto involucrado en la formación del complejo proteína-colorante, diferentes estudios han evidenciado que el fenómeno sucede principalmente por la interacción de los grupos sulfónicos de la molécula de CBG con los aminoácidos básicos, arginina y lisina, y, en menor medida, con aminoácidos aromáticos. Además, se ha demostrado que las interacciones no electrostáticas también juegan un rol importante^[4]. Este aspecto se evidencia en la variabilidad que suele existir en la cuantificación de proteínas que poseen diferentes proporciones de aminoácidos básicos en su secuencia de aminoácidos^[5,6], por lo tanto, la elección de la proteína a utilizar como estándar es de gran importancia. La Albúmina Sérica Bovina (BSA, por sus siglas en inglés) es una de las más ampliamente utilizadas.

A lo largo de los años, se han introducido métodos alternativos para la cuantificación de proteínas en muestras biológicas, como el método de Lowry, el del ácido bicinónico (BCA) y métodos más específicos basados en inmunoensayos. En cualquier caso, la elección del método de trabajo es un paso crítico para la obtención de resultados confiables y depende, entre otros factores, del nivel de sensibilidad requerido, del rango de concentraciones de trabajo, de la presencia de agentes interferentes y de la composición de la muestra^[2].

La Heparina (Hep) es un polisacárido aniónico sulfatado que pertenece a la familia de los glucosaminoglicanos. Sus propiedades estructurales le otorgan la capacidad de interactuar con un gran

número de proteínas, lo que da lugar a una variedad de funciones farmacológicas como anticoagulante, antiviral, antitumoral y anti-inflamatoria^[7]. Además de su principal y ampliamente conocida actividad como anticoagulante, en las últimas décadas, la ciencia ha revelado un complejo perfil farmacodinámico de la Hep y sus derivados que demuestran un número cada vez mayor de actividades biológicas para esta familia de moléculas^[8,9].

En la industria biofarmacéutica, la Hep se utiliza en técnicas de purificación de proteínas, como la cromatografía de afinidad con heparina (Heparin Affinity Chromatography, HAC), donde ciertas proteínas se unen selectivamente a la Hep permitiendo la purificación de las mismas a partir de mezclas complejas. Además, se utiliza como estabilizante en la formulación de medicamentos biológicos constituidos por proteínas recombinantes o purificadas de plasma, ayudando a mantener la integridad y actividad biológica de estas proteínas durante el proceso de producción y almacenamiento, entre otras aplicaciones. Particularmente, en la formulación de Concentrados de Factores de la Coagulación (CFC), la Hep se agrega en cantidades conocidas (como excipiente), con el fin de inhibir la potencial presencia de factores activados^[10]. Los CFC se utilizan en el tratamiento y profilaxis de hemorragias en pacientes con deficiencia congénita o adquirida de factores de la coagulación.

Sin embargo, el uso de los CFC trae aparejado el riesgo de desarrollo de complicaciones tromboembólicas^[11]. Aunque se desconoce la naturaleza exacta de los componentes que serían responsables de dichas complicaciones, éstas estarían asociadas, entre otras cosas, a la presencia de remanentes de factores activados. Entre ellos, se ha identificado al Factor IX activado como un componente importante en estas manifestaciones clínicas indeseadas^[12,13]. En consecuencia, a fin de reducir el riesgo trombogénico de los CFC, la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia recomienda el agregado de Hep en la formulación final de estos medicamentos biológicos.

Tanto la concentración de PT como la concentración máxima permitida de Hep en los CFC se encuentran detalladas en las correspondientes monografías de especialidades medicinales de la Farmacopea Europea (FE)^[14] y, por lo tanto, la correcta cuantificación de PT es de gran importancia para cumplir con los requisitos regulatorios.

En Argentina, la industria farmacéutica se encuentra regulada por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). Y la Farmacopea Argentina^[15] establece las especificaciones para definir la calidad física, química y/o biológica de productos medicinales y excipientes destinados para uso humano.

En este trabajo se evaluó la interferencia de Hep en la cuantificación de PT por el método de Bradford, en soluciones de BSA y en muestras proteicas complejas como las procedentes de procesos de purificación de CFC. Además, se estudió el efecto del agregado de Polybrene (Poly), agente neutralizante de Hep, previo a la cuantificación de PT y, como método comparativo, se utilizó el método del BCA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos: Heparina sódica 5000 UI/ml (Sobrius); Polybrene (Sigma Aldrich); Albumina Sérica Bovina 7 g% (NIST, Lote 927e); *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Sigma Aldrich); cloruro de sodio (Sigma-Aldrich); ácido fosfórico 85 % p.a. (Cicarelli), etanol 95 % (Porta Hnos) y agua de osmosis.

Reactivo de Bradford: se disolvieron 100 mg de CBG en 50 ml de etanol 95 % y se adicionaron 100 ml de ácido fosfórico 85 % p.a. Luego, se trasvasó a un matraz de 1000 ml y se llevó a volumen final con agua de osmosis. El reactivo se conservó en frasco de vidrio color caramelo a temperatura ambiente.

Reactivo de BCA: se utilizó el reactivo provisto en el kit comercial *BCA Protein Assay* (Thermo, Lote TG269570).

Solución fisiológica: se disolvieron 9 g de Cloruro de Sodio en un volumen final de 1000 ml de agua de osmosis.

Polybrene 300 mg%: se disolvieron 150 mg de Poly en 50 ml de agua de osmosis.

Heparina: a partir de la solución 5000 UI/ml se prepararon soluciones de trabajo de 150, 60 y 30 UI/ml, usando solución fisiológica como diluyente.

Muestras de CFC: Muestras del proceso de purificación de factores de la coagulación, pre (preH) y post agregado de Hep (postH), de 4 (cuatro) procesos elaborados a escala piloto en el Laboratorio de Hemoderivados (LH).

Método de Bradford: El método se aplicó según se describe en la Sección 2.5.33: Proteínas Totales de FE^[14] y fue previamente validado en el LH, según los lineamientos descritos en la guía Eurachem 1ra Edición 2016^[16] y guía ICH Q2: Validación de procedimientos analíticos^[17].

Las soluciones estándares se prepararon a partir de la solución de BSA 7 g% (NIST), usando solución fisiológica como diluyente. El rango lineal del método validado es de 20 a 100 mg%^[18].

Para la ejecución del método, se colocaron en diferentes tubos de hemólisis de vidrio 100 µl de cada condición: solución estándar, muestras problema o blanco. Se adicionaron 5 ml de reactivo de Bradford a cada tubo, se homogeneizó y se procedió a realizar la lectura espectrofotométrica a 595 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Ultrospect 8000 (GE Healthcare), utilizando una cubeta de vidrio de 1 cm de paso óptico. Cada condición se ensayó por quintuplicado de manera independiente. A partir de las Abs_{595nm} obtenidas con las soluciones de estándar, se obtuvo la curva de calibración como Abs_{595nm} vs Concentración (mg%) y, mediante la ecuación de la recta, se determinó la concentración de PT en las muestras problema.

Evaluación de la interferencia de Hep: se prepararon 7 soluciones de BSA 40 mg% conteniendo diferentes concentraciones de Hep en el rango de 0,8 a 24,0 UI/ml y luego, se cuantificaron las PT aplicando el método tal como se describió en el ítem anterior. Se calculó el porcentaje de recuperación (R%) de cada condición con Hep tomando como 100 % el valor de PT de la solución BSA 40 mg% sin Hep. Se consideró como criterio de aceptación un R%= 100 ± 15%.

Evaluación de agregado de Poly previo a la determinación de PT: se prepararon soluciones de BSA 40 mg% con diferentes concentraciones finales de Hep y Poly según se detalla en la **Tabla 1**. La máxima concentración de Hep evaluada en este ensayo se definió considerando el límite permitido para los CFC descrita en FE^[14].

Considerando que 100 mg% de Poly neutralizan 100 UI/ml de Hep^[19], se realizó el agregado de Poly de modo tal que toda la Hep presente fuera neutralizada, como así también el agregado de Poly en exceso con respecto a la cantidad de Hep presente en la solución.

Se cuantificaron las PT aplicando el método de Bradford, tal como se describió previamente, y se calculó el R% tomando como 100 % el valor de PT de la solución BSA 40 mg% sin Hep. Se consideró como criterio de aceptación un R% = 100 ± 15 %.

Método del ácido bicinconínico (BCA): Se utilizó el método farmacopeico (Método 4 de Sección 2.5.33: Proteínas Totales, de FE^[14], adaptado a microplaca. Este fue previamente validado en el LH, según los lineamientos descritos en la guía Eurachem 1ra Edición 2016^[16] y guía ICH Q2: Validación de procedimientos analíticos^[17].

Se utilizó el kit comercial *BCA Protein Assay* (Thermo, Lote TG269570). Las soluciones estándar se prepararon como diluciones seriadas a partir de la solución 200 mg% provista en el kit, usando solución fisiológica como diluyente. El rango lineal del método validado en el LH es de 3,125 a 200 mg%^[20].

Para la ejecución del método se colocaron 25 µl de cada condición: solución estándar, blanco y muestras problema en diferentes pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano. Cada condición se ensayó por triplicado de manera independiente. Seguidamente, se adicionaron 200 µl de reactivo color a cada pocillo, y se incubó la placa a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, se procedió a realizar la lectura espectrofotométrica a 562 nm en un lector de microplaca EPOCH 2 (Biotek). A partir de las Abs_{595nm} obtenidas con las soluciones de estándar, se obtuvo la curva de calibración como Log Abs_{562nm} vs Log Concentración y, mediante la ecuación de la recta, se determinó la concentración de las muestras problema en mg%.

Análisis estadístico: Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el software Infostat^[21]. Se aplicó el test estadístico de comparación de medias t-student considerando un nivel de significancia nominal α 0.05.

TABLA 1: CONDICIONES EVALUADAS EN EL ESTUDIO DEL AGREGADO DE POLY PREVIO A LA DETERMINACIÓN DE PT POR BRADFORD EN MUESTRAS DE BSA

Condición		Descripción
sin Hep	BSA (40 mg%)	Solución sin Hep (100 %).
con Poly	BSA + Poly 60 mg%	Para evaluar si el Poly por sí solo interfiere en la determinación.
	BSA + Poly 24 mg%	
	BSA + Poly 12 mg%	
con Hep + Poly (proporcional)	BSA + Hep 60 UI/ml + Poly 60 mg%	En cada caso, la cantidad de Poly es tal que neutraliza toda la Hep presente.
	BSA + Hep 24 UI/ml + Poly 24 mg%	
	BSA + Hep 12 UI/ml + Poly 12 mg%	
con Hep + Poly (en exceso)	BSA + Hep 24 UI/ml + Poly 60 mg%	La cantidad de Poly está en exceso respecto a la cantidad de Hep.
	BSA + Hep 12 UI/ml + Poly 60 mg%	
	BSA + Hep 24 UI/ml + Poly 32 mg%	
	BSA + Hep 12 UI/ml + Poly 32 mg%	

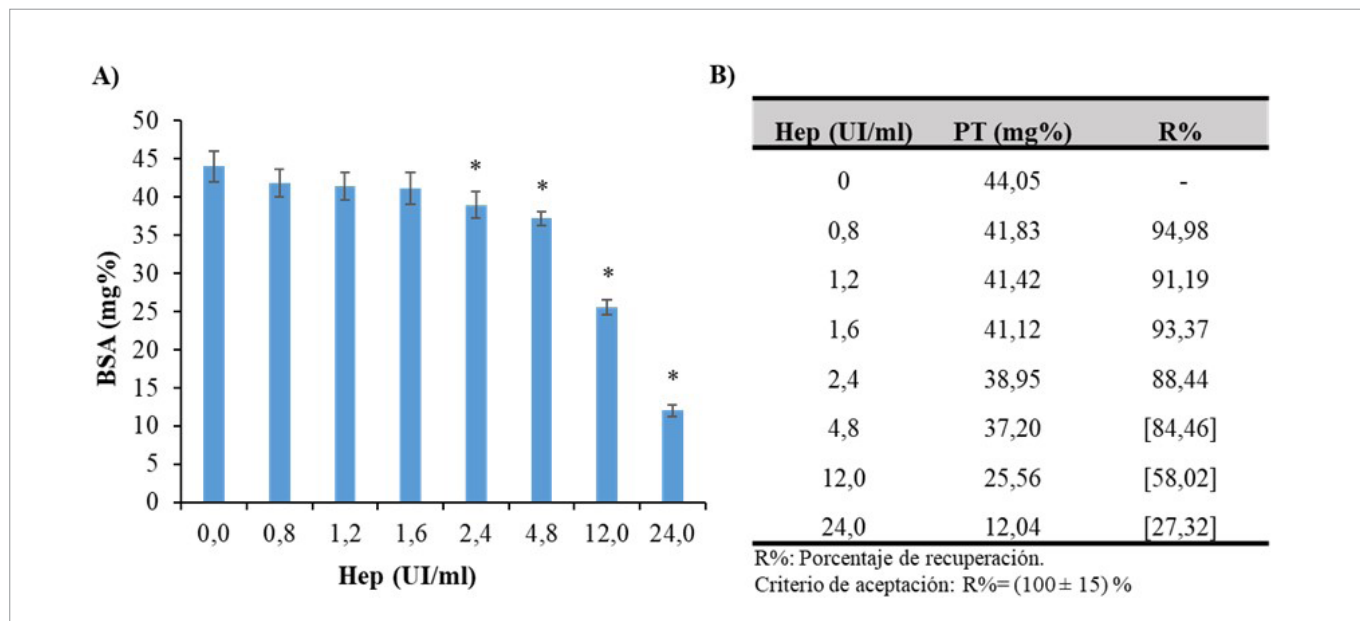


Figura 1: a) Cuantificación de PT por Bradford en muestras de BSA fortificadas con diferentes concentraciones de Heparina (0,8 a 24,0 UI/ml). * denota significancia estadística para $p < 0,05$ con respecto a la condición BSA sin Hep. b) Valores de concentración de PT obtenidos para las muestras de BSA con Heparina y valores de R% calculados respecto de la condición sin Heparina (0 UI/ml). Datos que no cumplen con el criterio de aceptación se muestran entre corchetes.

RESULTADOS

Evaluación de la interferencia de Hep en la determinación de PT por Bradford

La **Figura 1A** muestra los valores de concentración de PT determinados por Bradford para soluciones de BSA 40 mg%, fortificadas con diferentes concentraciones de Hep. Además, en la **Figura 1B**, se muestran los R% calculados tomando como 100 % el valor de concentración de la solución de BSA 40 mg% sin Hep.

Análisis de agregado de Polybrene previo a la determinación de PT por método de Bradford

El agregado de Poly se realizó en cantidades tales que toda la Hep presente en las muestras sea neutralizada como así también en exceso con respecto a la cantidad de Hep presente en la solución (**Tabla 1**). Los valores de concentración de PT obtenidos para cada condición se detallan en la **Figura 2**.

Determinación de PT en muestras de CFC por los métodos de Bradford y BCA

Se trabajó con muestras de 4 (cuatro) procesos de purificación de CFC. Para cada proceso, se midieron muestras pre (preH) y post (postH) al agregado de una cantidad conocida de Hep. Se cuantificaron las PT de las muestras mediante Bradford (Brd), Bradford con neutralización previa con Poly (Brd + Poly) y por BCA, este último como método comparativo. Para el caso de Brd + Poly, éste fue agregado en cantidades equivalentes para neutralizar toda la Hep presente. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 2**.

DISCUSIÓN

Considerando que el método de Bradford es ampliamente utilizado en la determinación de PT en la industria biofarmacéutica^[2] y que la Hep es una sustancia que se emplea habitualmente como excipiente durante la elaboración de CFC^[10], surgió la necesidad de estudiar la interferencia de la Hep en la determinación de PT, por ser un requisito regulatorio que define la calidad de la especialidad medicinal.

En este trabajo se demostró que la Hep presente en soluciones proteicas provoca una significativa interferencia, involucrando un error por defecto en la determinación de PT por el método de Bradford y que la interferencia es concentración-dependiente de la Hep.

Para determinar la concentración límite de Hep que interfiere en la cuantificación de PT por este método se calculó el R% tomando como 100 % el valor de PT de la solución de BSA 40 mg% sin Hep. Desde la concentración de Hep 4,8 UI/ml y mayores, el R% no cumple el criterio de aceptación. A la concentración de 2,4 UI/ml, si bien el R% es aceptable, el valor se encuentra al límite del criterio de aceptación. Adicionalmente, el análisis estadístico demostró que dicho valor difiere significativamente de la condición sin Hep (* $p < 0,05$). La concentración máxima de Hep que no interfirió en la determinación de PT fue de 1,6 UI/ml (**Figura 1**). La máxima concentración de Hep evaluada en la **Figura**

1 corresponde al valor de Hep que se agrega como excipiente durante los procesos de purificación de CFC en el LH. Cabe destacar que, si se trabaja con un nivel de concentración menor de proteínas, una proteína diferente o con mezclas complejas de proteínas, se debe evaluar el grado de interferencia para cada caso particular, pudiéndose utilizar los valores obtenidos en este trabajo como referencia.

El método de Bradford es muy ventajoso por su rápida ejecución y bajo costo^[1], y la elección de un método alternativo no siempre es una opción disponible. Es por ello que se consideró evaluar si el agregado de Poly, usado como neutralizante de la Hep, revierte el efecto de interferencia observado. Para ello, se analizaron soluciones de BSA 40 mg% con diferentes concentraciones finales de Hep y Poly (**Tabla 1**). Adicionalmente, se evaluó el agregado de Poly en exceso para considerar si una cantidad fija del mismo, independientemente de la cantidad de Hep presente, puede ser utilizada para simplificar el ensayo desde el punto de vista metodológico. En las muestras sin Hep, se observó que el agregado de Poly arrojó un error por exceso en la cuantificación de las PT, el cual aumenta proporcionalmente a la concentración de Poly. Por otro lado, para el agregado de Poly en cantidades equivalentes, los valores de R% fueron aceptables. Asimismo, las muestras que contenían exceso de Poly con respecto a la cantidad de Hep, si bien presentaron R% dentro de los límites aceptados, estos fueron levemente mayores que en las muestras con Poly equivalente, siendo este efecto más marcado mientras mayor es el exceso de Poly (**Figura 2**). Esto podría relacionarse con el hecho de que, el agregado de Poly solo también generó interferencia en el método de Bradford, causando una sobreestimación de las PT. Consecuentemente, el Poly en exceso que no reacciona con la Hep, comenzaría a interferir en la determinación de PT. De esta manera, se demostró que el agregado de Poly en cantidades equivalentes para neutralizar la Hep presente sería la opción más conveniente para una correcta determinación de proteínas por Bradford.

Considerando que el método de Bradford presenta variabilidad según la naturaleza de las proteínas presentes en la muestra problema^[5,6], se aplicó Bradford a la medición de PT en soluciones proteicas complejas como las provenientes de procesos de purificación, productos finales, etc., de derivados plasmáticos con el fin de comprobar si los resultados observados para BSA se reproducían en este tipo de muestras. Para ello, se analizaron muestras provenientes de 4 procesos de purificación de CFC y se midieron muestras preH y postH. En este punto, es importante remarcar que el agregado de Hep durante el proceso de purificación de los CFC se realiza en función de la cantidad de FIX presente, y este a su vez, se relaciona con la cantidad de PT de la muestra, de acuerdo a los requisitos de calidad detallados en FE^[14]. Por lo tanto, en las muestras evaluadas en este estudio, la relación Hep:PT no varía significativamente de un proceso a otro. Se cuantificaron las PT de las muestras mediante Bradford, y los resultados se compararon con los obtenidos previa neutralización con Poly en cantidades equivalentes (Brd + Poly) y por BCA

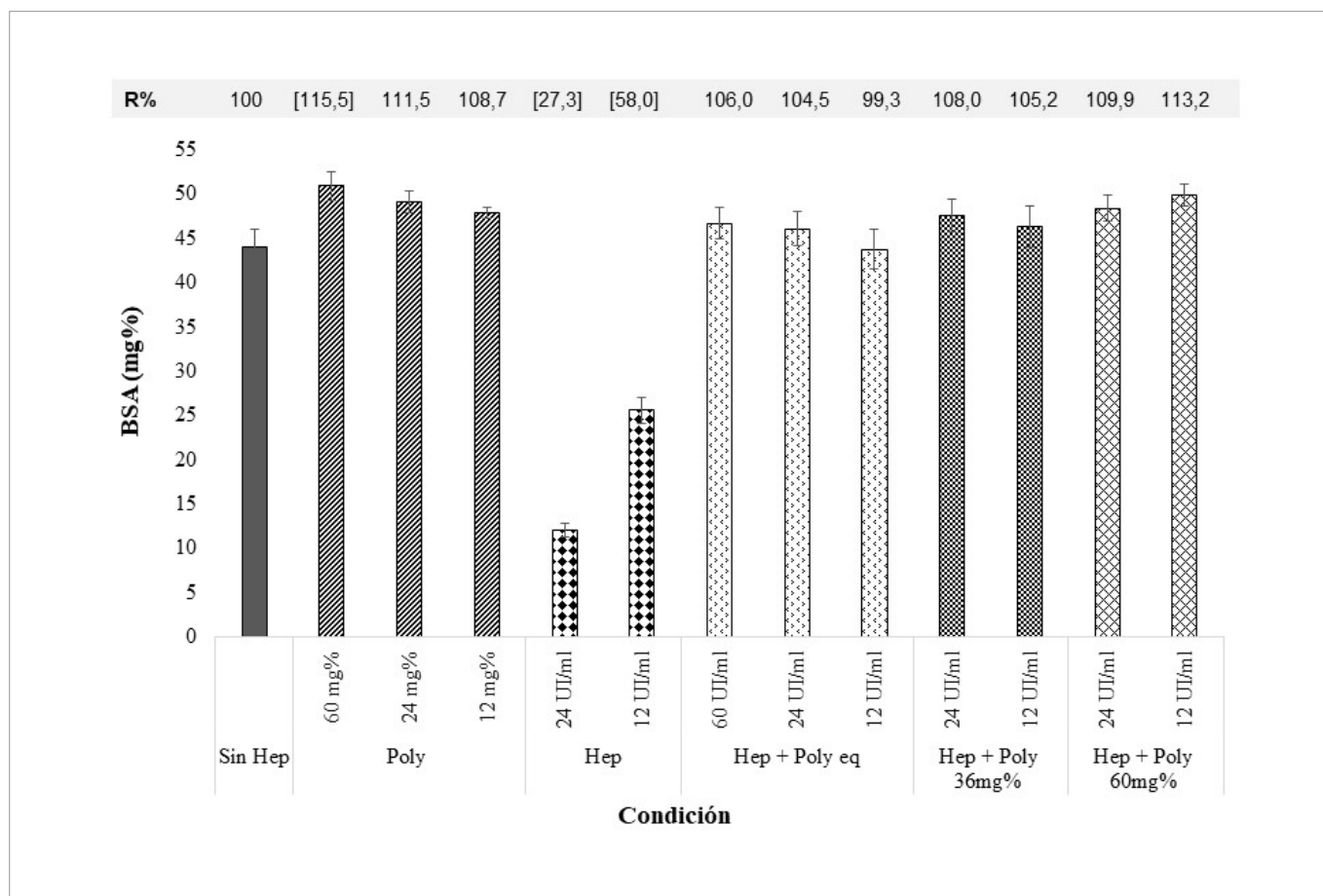


Figura 2: Determinación de PT por Bradford en muestras de BSA fortificadas con diferentes concentraciones de Hep y Poly. Los valores de R% calculados con respecto al valor de PT de la solución sin Hep se muestran en el extremo superior del gráfico. Datos que no cumplen con el criterio de aceptación se muestran entre corchetes.

TABLA 2: VALORES DE PT (mg%) Y R% EN MUESTRAS DE PROCESO DE PURIFICACIÓN DE CFC, PRE Y POST AGREGADO DE HEP

Método	Proceso 1			Proceso 2			Proceso 3			Proceso 4		
	preH	postH	R%	preH	postH	R%	preH	postH	R%	preH	postH	R%
Brd	141,2	105,8	[74,9]	47,2	24,5	[52,0]	68,6	44,0	[64,1]	39,8	19,0	[47,8]
Brd + Poly	-	129,7	91,9	-	38,3	[81,2]	-	54,4	[79,3]	-	28,1	[70,7]
BCA	135,8	131,9	97,1	53,6	47,5	88,5	63,3	63,3	100,0	42,8	38,5	90,1

R% para muestras post H medidas por Brd y Brd + Poly se calcularon tomando como 100 % el valor pre H medido por Brd. R% para muestras post H medidas por BCA se calcularon tomando como 100 % el valor pre H medido por BCA.

Datos que no cumplen con el criterio de aceptación se muestran entre corchetes.

como método comparativo, en el cual la Hep no constituye un interferente (Tabla 2). Consistentemente con los resultados obtenidos para las muestras de BSA (Figura 1), se observó interferencia de Hep en la determinación de PT por el método de Bradford, siendo éste de mayor magnitud en los procesos con valores de PT más bajos. Se obtuvieron valores de R% entre el 48 y 75 % para las muestras postH con respecto a las preH. Por otro lado, cuando se neutralizó con Poly previo a la determinación por Bradford, se observó un aumento en las PT para las muestras postH comparado con el valor medido sin agregado de Poly, en los 4 procesos ensayados. En este caso, si bien los R% aumentaron, se observó que, en 3 de los 4 procesos, los valores de R% no cumplen con el criterio de aceptación ($R\% = 100 \pm 15 \%$). De esta manera, se demostró que, a diferencia de lo observado en las muestras de BSA, la neutralización de la Hep no fue completa en las muestras de procesos de CFC, en las que se observó cierto grado de interferencia.

Con respecto a la determinación por BCA, se observó que, para los 4 procesos, los valores de PT en las muestras preH y postH no mostraron diferencias significativas. Estos resultados permiten corroborar que la disminución de las PT observada con el método de Bradford fue provocada por la interferencia de la Hep presente en las muestras. Con respecto a la variación observada entre los valores de PT de las muestras preH, obtenidos por los métodos Bradford y BCA para cada proceso, el análisis estadístico demostró que dichos valores no difieren significativamente ($* p < 0,05$) (Tabla 2).

Desde el punto de vista de la estructura molecular, la Hep posee una alta densidad de cargas negativas, por lo que interacciona con las moléculas proteicas a través de las cargas positivas de los aminoácidos básicos^[22]. Dado que el colorante CBG también interacciona con las proteínas uniéndose principalmente a los aminoácidos básicos^[4], esta podría ser la causa por la cual se observó la interferencia. Una posible hipótesis que explique lo observado podría ser que la Hep presente en las muestras interaccione con las proteínas a través de dichas secuencias básicas, impidiendo la unión del colorante cuando se ensaya el método de Bradford. De esta manera, no se formaría el complejo proteína-colorante y esto daría un error por defecto en la cuantificación. Al agregar previamente el Poly, éste interaccionaría con las moléculas de Hep dejando libre los aminoácidos básicos, que en estas condiciones podrían interaccionar con el colorante. Esto explicaría la reversión del efecto interferente.

CONCLUSIÓN

Los hallazgos obtenidos en este trabajo son de suma importancia porque demuestran que la Hep es un interferente en la cuantificación de PT por el método de Bradford, lo cual tiene una importancia significativa dado que esta información no se encuentra descrita en los insertos de los kits comerciales de uso habitual ni en la Farmacopea Europea (Total protein 2.5.33). En cuanto a la alternativa de utilizar Poly como neutralizante de la Hep previo a la determinación de PT por Bradford, si bien fun-

cionó de manera satisfactoria para una muestra pura de BSA, los resultados obtenidos para mezclas de proteínas complejas como las de procesos de purificación de CFC, no fueron satisfactorios. Por lo tanto, se destaca que, si se desea utilizar alternativamente la neutralización con Poly previo a la aplicación del método de Bradford, se recomienda la evaluación de cada caso particular según las características de la muestra proteica en estudio. Si esto no es posible, debe seleccionarse un método alternativo donde la Hep no sea un interferente como, por ejemplo, el método BCA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Noble JE, Bailey MJA. Quantitation of protein. *Methods in enzymology: Chapter Eight*. 2009 Vol. 463.
2. Walls D, Loughran ST. Protein chromatography: Methods and protocols. *Methods in Molecular Biology*. 2017. Vol. 1485.
3. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976. 72:248-254.
4. Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem*. 1985. 151:369-74.
5. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *The Protein Protocols Handbook*. 2009.
6. Noble JE, Knight AE, Reason AJ, Di Matola A, Bailey MJA. A comparison of protein quantitation assays for biopharmaceutical applications. *Molecular biotechnology*. 2007. 37(2):99-111.
7. Hemker HC. A century of heparin: past, present and future. *J Thromb Haemost*. 2016. 14(12):2329-2338.
8. Beurskens DMH, Huckriede JP, Schrijver R, Hemker HC, Reutelingsperger CP, Nicolaes GAF. The Anticoagulant and non anticoagulant properties of Heparin. *ThrombHaemost*. 2020. 120(10):1371-1383.
9. Wang P, Chi L, Zhang Z, Zhao H, Zhang F, Linhardt RJ. Heparin: An old drug for new clinical applications. *Carbohydr Polym*. 2022. 1(295):119818.
10. Sanford NG, Ronald CS, Stanford W. In vitro and in vivo correlation of clotting protease activity: effect of heparin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977. 74(7):3028-32.
11. Franchini M, Lippi G. Prothrombin complex concentrates: an update. *Blood Transfus*. 2010. 8(3):149-54.
12. Gray E, Tubbs J, Thomas S, Oates A, Boisclair M, Kembell-Cook MG, Barrowcliffe TW. Measurement of activated factor IX in factor IX concentrates: correlation with in vivo thrombogenicity. *Thrombosis and Haemostasis*. 1995. 73:675-79.
13. Lowe GDO. Factor IX and thrombosis. *British Journal of Haematology*. 2001. 115:507-513.
14. Consejo de Europa. Farmacopea Europea. 10ma Edición. Europa: EDQM. 2022
15. Comisión permanente de la Farmacopea Argentina. Farmacopea Argentina. 7ma Edición. Argentina: Ministerio de Salud. 2013. Vol. 3

16. Morillas PP et al. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. 2016. Disponible en: www.eurachem.org
17. International Committee for Harmonization, ICH. Guidance for Industry: Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology - 1996. Disponible en: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>
18. Documento Interno LH: LH-DT-AC-020-R1. Determinación de proteínas totales por Bradford-Micrométodo. Marzo 2022.
19. Cumming AM, Jones GR, Wensley RT, Cundall RB. In vitro neutralization of heparin in plasma prior to the activated partial thromboplastin time test: An assessment of four heparin antagonists and two anion Exchange resins. *Thrombosis Research*. 1986. 41(1):43-56.
20. Documento Interno LH: LH-DT-AC-020-R1. Determinación de proteínas totales por ácido bicinónico (BCA). Agosto 2022.
21. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, UNC, Argentina.
22. Capila I, Linhardt RJ. Heparin-protein interactions. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2002. 1;41(3):391-412.



Esta licencia permite compartir y adaptar el material. Se puede distribuir el material en cualquier medio o formato y remezclar, transformar y crear a partir del mismo para cualquier finalidad, incluso comercial. Bajo la condición de reconocer adecuadamente la autoría, proporcionar un enlace a la licencia e indicar si se han realizado cambios.