

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**Remoção de Auto-Anticorpos:
Imunoadsorção Utilizando Proteína L como Ligante**

Eng^a Isa Santos Duarte
Mestranda

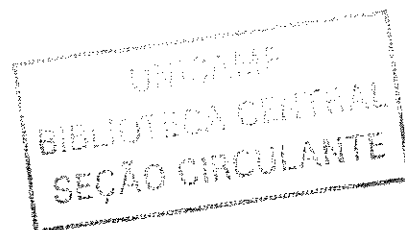
Prof.^a Dr.^a Sônia Maria Alves Bueno
Orientadora

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner
Co-orientador

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas, São Paulo
Dezembro de 2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



UNIDADE	FB
Nº CHAMADA	UNICAMP
	D85r
V	
P	48510
REL	16-837/02
C	17
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00166494-6

3 ID 16-837/02

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

D85r

Duarte, Isa Santos.

Remoção de auto-anticorpos: imunoadsorção
utilizando proteína L como ligante / Isa Santos Duarte.--
Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientadores: Sônia Maria Alves Bueno; Ricardo de
Lima Zollner.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Imunoglobulinas. 2. Cromatografia de afinidade. I.
Bueno, Sônia Maria Alves. II. Zollner, Ricardo de Lima.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

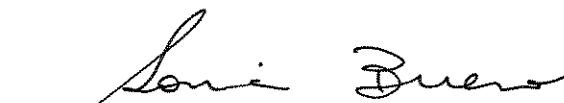
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Remoção de Auto-Anticorpos:
Imunoadsorção Utilizando Proteína L como Ligante**

Autora: Eng^a Isa Santos Duarte

Orientadora: Prof^a Dr^a Sônia Maria Alves Bueno

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner



Prof^a Dr^a Sônia Maria Alves Bueno
Universidade Estadual de Campinas - FEQ



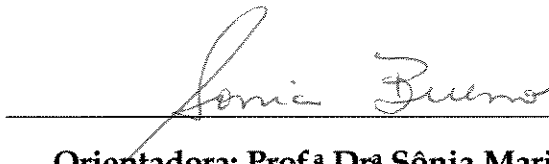
Prof. Dr. Benedito de Oliveira Filho
Universidade Estadual de Campinas - IB



Prof. Dr. Everson Alves Miranda
Universidade Estadual de Campinas - FEQ

200217644

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida pela Eng^a Química Isa Santos Duarte e aprovada pela comissão julgadora em 18 de dezembro de 2001.



Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sônia Maria Alves Bueno

Aos meus queridos pais, Adilson e Eva.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus agradecimentos a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, em especial:

A Deus.

À tia Maroca e à minha família, pelo incentivo e amor incondicional.

Ao Marco, pelo apoio e companheirismo.

Aos orientadores Prof.^a Dr.^a Sônia Maria Alves Bueno e Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner pela paciência, competência e profissionalismo.

À Prof.^a Dr.^a Maria Helena Andrade Santana e ao Prof. Dr. Everson Alves Miranda pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

À Dr.^a Célia Regina Garlipp e ao Marco Antônio Moda do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da Unicamp, pela realização de experimentos de nefelometria.

Aos amigos dos laboratórios da FEQ: Adriana, Adriano, André, Antenor, Chrissana, Cristiane, Elaine, Elcimar, Gilson, Gisele, Kátia, Líbia, Lucas, Luciana, Mirela, Oselys, Romi, Rosana, Salah, Sindélia e Vinícius, pelas sugestões e companheirismo no laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Alergia Clínica: Conceição, Bethânia e Marcelo, pela ajuda na etapa final deste trabalho.

Às companheiras Luciana Cambraia, Cláudia, Maria Isabel e a todos amigos de Beagá, em especial: Robiana, Guilherme, Edwan e turma do Arqui.

Ao apoio financeiro do CNPq, FAPESP e FAEP.

Com

Auto-estima

Motivação

Organização e

Responsabilidade,

consegue-se tudo.

RESUMO

As doenças auto-imunes são distúrbios em que o sistema imunológico reage contra células ou componentes teciduais do próprio organismo com incidência de aproximadamente 10% da população brasileira. Normalmente, o tratamento das doenças auto-imunes sistêmicas é feito com a administração de medicamentos que estabilizam a doença, mas expõem o indivíduo aos seus efeitos colaterais. Terapias alternativas têm sido propostas, dentre elas, a terapia de adsorção seletiva de auto-anticorpos. Nesse tratamento, o plasma do paciente é adicionado à coluna contendo um ligante imobilizado com objetivo de remoção de auto-anticorpos e retorno ao paciente das proteínas não adsorvidas. Este trabalho investigou o emprego do gel agarose-proteína L como adsorvente para remoção de auto-anticorpos. A fim de se determinar as melhores condições de adsorção de IgG neste suporte, testou-se cinco sistemas tamponantes. A maior adsorção de proteína foi obtida em presença de tampão Hepes. Além deste tampão e em decorrência de suas propriedades próximas às fisiológicas, empregamos PBS. A seletividade do suporte em adsorver imunoglobulinas G, M e A foi analisada através de ensaios cromatográficos a partir do soro humano sadio, nos quais a identificação das proteínas retidas e não retidas pelo adsorvente foi realizada por meio de eletroforese SDS-PAGE e nefelometria. A partir de isotermas de adsorção, determinou-se a capacidade do adsorvente (4,3 mg IgG/mL gel) e a constante de dissociação do complexo IgG-proteína L ($2,8 \times 10^{-7}$ M), parâmetros importantes para ampliação de escala. Investigou-se a retenção e a adsorção *in vitro* dos auto-anticorpos, anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-Sm e anti-dsDNA em gel agarose-proteína L. Os resultados obtidos mostraram que o suporte de afinidade apresenta maior porcentagem de remoção de anti-Sm (88%) e anti-dsDNA (87%).

Palavras-chave: Proteína L, Auto-anticorpos, Imunoadsorção, Afinidade, Tratamento extracorpóreo.

ABSTRACT

The autoimmune diseases are disturbances in which the immune system produces potentially destructive antibodies against cells or tissue components of the human body. These diseases affect about 10% of the Brazilian population. The usual treatment is accomplished with drugs which stabilize the disease, although exposing the patient to side effects. Alternative therapies have been proposed, for example the selective adsorption of autoantibodies. In this treatment, the patient's plasma is passed through an adsorber equipment which contends immobilized ligands that remove the autoantibodies; the non-retained proteins return to the patient. This work investigated the removal of autoantibodies employing protein L-agarose as the adsorbent. In order to determine the better conditions of adsorption of IgG on this matrix, five buffer systems were tested. The higher protein adsorption was found in the presence of the buffer Hepes. Besides, PBS was also selected due to its physiological property. The selectivity of the matrix relative to the immunoglobulins G, M and A was analysed through chromatographic assays starting of healthy human serum. The identification and quantification of the retained and non-retained proteins were accomplished by means of the SDS-PAGE electrophoresis and nephelometry, respectively. The adsorbent capacity and the dissociation constant of the complex IgG-protein L were determined from adsorption isotherms. The *in vitro* retention and adsorption of autoantibodies anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B, anti-Sm and anti-dsDNA in protein L-agarose gel were also measured. The results indicated that the affinity matrix presents higher adsorption capacity for anti-Sm and anti-dsDNA than for the other two autoantibodies studied.

Keywords: Protein L, Autoantibodies, Immunoabsorption, Affinity, Extracorporeal treatment.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE FIGURAS.....	xxi
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 DOENÇAS AUTO-IMUNES	5
2.2 AUTO-ANTICORPOS	6
2.3 TRATAMENTO DAS DOENÇAS AUTO-IMUNES	9
Princípio do tratamento extracorpóreo por adsorção seletiva de auto-anticorpo	11
Ligante de afinidade proteína L.....	14
2.4 MODELOS DE ISOTERMAS.....	16
Modelo de Langmuir	16
Modelo de Langmuir-Freundlich	17
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 MATERIAIS.....	21
3.1.1. Adsorvente.....	21
3.1.2. Imunoglobulina G, soro humano e “pools” de soros de pacientes com doenças auto-imunes.....	21
3.1.3. Reagentes	22
3.2 MÉTODOS	23
3.2.1. Preparação das amostras de soro humano.....	23
3.2.2. Formação de “pools” de soros contendo auto-anticorpos	23
3.2.3. Quantificação de proteínas.....	23
3.2.4. Ultrafiltração.....	24
3.2.5. Eletroforese SDS-PAGE	24
3.2.6. Dosagem dos níveis de IgG, IgA, IgM e albumina.....	24
3.2.7. Dosagem de auto-anticorpos.....	25
3.2.8. Ensaios cromatográficos	26
Influência do sistema tamponante na adsorção	27
Obtenção de isotermas de adsorção	27
Ensaios com soro humano sadio.....	28
Ensaios com “pools” de soros contendo auto-anticorpos.....	29

3.2.9. Experimentos em frascos agitados.....	31
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 INFLUÊNCIA DO SISTEMA TAMPONANTE NA ADSORÇÃO DE IgG HUMANA EM AGAROSE-PROTEÍNA L.....	32
4.2 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO.....	37
4.3 EXPERIMENTOS COM SORO HUMANO SADIO	46
4.4 EXPERIMENTOS COM “POOLS” DE SOROS CONTENDO AUTO-ANTICORPOS.....	52
4.4.1. Remoção de auto-anticorpos	52
4.4.2. Adsorção de auto-anticorpos	57
4.4.3. Experimentos em frascos agitados.....	61
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS	65
5.1 CONCLUSÕES.....	65
5.2 SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS	67
CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Dosagem dos níveis de anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-Sm e anti-dsDNA presentes nos “pools” 1 e 2.....	23
Tabela 4.1: Balanço de massa do cromatograma de IgG em agarose-proteína L, utilizando tampão de adsorção Fosfato de sódio a pH 7,5.....	33
Tabela 4.2: Quantidade de IgG adsorvida nos ensaios cromatográficos realizados com Hepes, Mops, Tris-HCl, Fosfato de sódio e PBS, a valores de pH na faixa de 7,0 a 8,0.....	34
Tabela 4.3: Influência da força iônica (I) na quantidade de IgG adsorvida nos ensaios cromatográficos realizados com Hepes, Mops, Tris-HCl, Fosfato de sódio e PBS, a pH 7,0.....	36
Tabela 4.4: Balanço de massa do cromatograma de IgG em agarose-proteína L, cromatografia em modo frontal utilizando tampão de adsorção PBS.....	38
Tabela 4.5: Parâmetros do modelo de Langmuir obtidos a partir do ajuste aos dados experimentais das isotermas de adsorção de IgG em agarose-proteína L, à temperatura ambiente, na presença de PBS 10 mM e Hepes 25 mM.....	40
Tabela 4.6: Parâmetros do modelo de Langmuir-Freundlich obtidos a partir do ajuste aos dados experimentais das isotermas de adsorção de IgG em agarose-proteína L, à temperatura ambiente, na presença de PBS 10 mM e Hepes 25 mM.	44
Tabela 4.7: Balanço de massa em relação às proteínas totais do soro humano sadio de cromatografias em coluna contendo agarose-proteína L, utilizando tampões de adsorção PBS e Hepes.....	48
Tabela 4.8: Balanço de massa para IgG, IgA e IgM, resultante das análises nefelométricas do soro humano sadio e das frações de lavagem e eluição da cromatografia utilizando PBS, com volume de leito igual a 3,4 mL.....	50
Tabela 4.9: Balanço de massa para IgG, IgA e IgM, resultante das análises nefelométricas do soro humano sadio e das frações de lavagem e eluição da cromatografia utilizando Hepes, com volume de leito igual a 3,4 mL.....	51
Tabela 4.10: Quantidade de IgG adsorvida nos ensaios cromatográficos realizados com IgG humana pura e com soro humano sadio, em presença de Hepes e PBS, a pH 7,4.....	52
Tabela 4.11: Resultados experimentais de remoção de anticorpos e albumina em agarose-proteína L a partir do “pool” 1.	53
Tabela 4.12: Resultados experimentais de remoção de anticorpos e albumina em agarose-proteína L a partir do “pool” 2.	54

Tabela 4.13: Resultados experimentais de adsorção de anticorpos e albumina em agarose-proteína L a partir do “pool”1.	58
Tabela 4.14: Resultados experimentais de adsorção de anticorpos e albumina em agarose-proteína L a partir do “pool”2.	59
Tabela 4.15: Comparação das porcentagens de remoção de anticorpos (%R) dos suportes de afinidade agarose-proteína L, Sepharose-proteína A, PVA-triptofano, PVA-fenilalanina e sulfato de dextrana, obtidas nos experimentos em frascos agitados.	62
Tabela 4.16: Comparação das porcentagens de remoção de anticorpos e albumina (%R) em agarose-proteína L, obtidas nos experimentos em frascos agitados (ausência de tampão) e nos ensaios com recirculação (presença de tampão PBS).	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Espectro de algumas doenças auto-imunes.....	6
Figura 2.2: Estrutura básica de uma molécula de imunoglobulina.....	7
Figura 2.3: Princípio do tratamento extracorpóreo por adsorção seletiva de auto-anticorpo	11
Figura 2.4: Representação esquemática de três diferentes estados de conformação de proteínas adsorvidas.....	19
Figura 2.5: Representação esquemática de um possível mecanismo de mudança conformacional de proteínas adsorvidas	20
Figura 3.1: Esquema da montagem experimental: sistema de cromatografia de baixa pressão.	26
Figura 3.2: Esquema da montagem experimental para remoção de auto-anticorpos em gel agarose-proteína L em circuito fechado.....	30
Figura 3.3: Esquema para remoção de auto-anticorpos em tubos agitados.....	31
Figura 4.1: Perfil cromatográfico de IgG em gel agarose-proteína L. Injeção de 7,98 mg de IgG humana. Tampão de adsorção, Fosfato de sódio 25 mM a pH 7,5 (▲); tampão de dessorção, glicina 0,1 M a pH 3,0 (■); vazão 0,5 mL/min; volume das frações, 3,0 mL; volume de leito: 0,88 mL	33
Figura 4.2: Estrutura dos tampões utilizados na etapa de adsorção de IgG em agarose-proteína L	35
Figura 4.3: Perfil cromatográfico de IgG em gel agarose-proteína L: Alimentação de 99 mL de IgG humana a 0,6 mg/mL (◆), tampão de lavagem, PBS 10 mM a pH 7,4 (■); tampão de dessorção, glicina 0,1 M a pH 3,0 (▲); vazão 0,5 mL/min; volume das frações, 3,0 mL	37
Figura 4.4: Comparação entre os dados experimentais (■) e o ajuste dos parâmetros do modelo de Langmuir (—), para a adsorção de IgG em agarose-proteína L utilizando tampão PBS 10 mM a pH 7,4	39
Figura 4.5: Comparação entre os dados experimentais (■) e o ajuste dos parâmetros do modelo de Langmuir (—), para a adsorção de IgG em agarose-proteína L utilizando tampão Hepes 25 mM a pH 7,4	39
Figura 4.6: Análise de Scatchard referente à linearização da equação do modelo de Langmuir para os dados experimentais de adsorção de IgG em agarose-proteína L utilizando tampão PBS 10 mM a pH 7,4.....	40
Figura 4.7: Análise de Scatchard referente à linearização da equação do modelo de Langmuir para os dados experimentais de adsorção de IgG em agarose-proteína L utilizando tampão Hepes 25 mM a pH 7,4.....	41

- Figura 4.8: Análise de Scatchard referente à linearização da equação do modelo de Langmuir, para os dados experimentais de adsorção de IgG em agarose-proteína L utilizando tampão Hepes 25 mM a pH 7,4.....42
- Figura 4.9: Análise de Scatchard referente à linearização da equação do modelo de Langmuir, para os dados experimentais de adsorção de IgG em agarose-proteína L utilizando tampão PBS 10 mM a pH 7,4.....42
- Figura 4.10: Comparação entre os dados experimentais (■) e o ajuste dos parâmetros do modelo de Langmuir-Freundlich (—), para a adsorção de IgG em agarose-proteína L utilizando tampão PBS 10 mM a pH 7,443
- Figura 4.11: Comparação entre os dados experimentais (■) e o ajuste dos parâmetros do modelo de Langmuir-Freundlich (—), para a adsorção de IgG em agarose-proteína L utilizando tampão Hepes 25 mM a pH 7,444
- Figura 4.12: Perfil cromatográfico de soro humano sadio em gel agarose-proteína L com tampão PBS. Injeção de 2,1 mL de soro humano sadio diluído 1:1 em tampão de adsorção. Tampão de adsorção, PBS 10 mM a pH 7,4 (▲); tampões de dessorção, glicina 0,1 M a pH 3,0 (■) e glicina 0,1 M a pH 2,0 (●); vazão 0,5 mL/min; volume das frações, 3,0 mL, volume de leito 3,4 mL.....46
- Figura 4.13: Perfil cromatográfico de soro humano sadio em gel agarose-proteína L com tampão Hepes. Injeção de 2,1 mL de soro humano sadio diluído 1:1 em tampão de adsorção. Tampão de adsorção, Hepes 25 mM a pH 7,4 (▲); tampões de dessorção, glicina 0,1 M a pH 3,0 (■) e glicina 0,1 M a pH 2,0 (●); vazão 0,5 mL/min; volume das frações, 3,0 mL, volume de leito 3,4 mL.....47
- Figura 4.14: Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida gradiente 4 a 15% de cromatografia de soro humano sadio em agarose-proteína L.....49
- Figura 4.15: Representação gráfica dos resultados de porcentagem de remoção (%R) de auto-anticorpos e albumina presentes no “pool” 1.....55
- Figura 4.16: Representação gráfica dos resultados de porcentagem de remoção (%R) de auto-anticorpos e albumina presentes no “pool” 2.....55
- Figura 4.17: Representação gráfica dos resultados de porcentagem de adsorção (%A) de auto-anticorpos e albumina presentes no “pool” 1.....60
- Figura 4.18: Representação gráfica dos resultados de porcentagem de adsorção (%A) de auto-anticorpos e albumina presentes no “pool” 2.....60

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

As doenças auto-imunes são distúrbios em que o sistema imunológico reage contra as células ou componentes teciduais do próprio indivíduo. No Brasil, aproximadamente 10% da população é acometida por alguma doença auto-imune que pode levar à incapacidade física. Tem-se demonstrado que aproximadamente metade dos pacientes do sexo masculino com artrite reumatóide está desempregada por causa de incapacidade física. O diabetes do tipo I, outro tipo bastante comum de doença auto-imune, é a causa principal de deficiência renal final nos pacientes, com custos elevadíssimos aos programas de saúde, decorrentes dos procedimentos de diálise de longa duração (FERREIRA & ÁVILA, 1996).

Normalmente, as doenças auto-imunes sistêmicas são tratadas com a administração de medicamentos como corticosteróides e imunossupressores, que podem estabilizar a doença, mas não curá-la. Além da não eliminação da doença, um outro inconveniente destes tratamentos é a administração prolongada dessas drogas, expondo o indivíduo aos seus efeitos colaterais, entre eles a deficiência de resposta imune (FUDENBERG *et al.*, 1980). Dessa forma, torna-se essencial o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, visando aumentar a eficácia e reduzir os efeitos colaterais das drogas.

Nessa tentativa, métodos alternativos têm sido investigados tanto experimentalmente em laboratório, quanto na clínica para tratar a fase aguda da doença, os quais removem do organismo auto-anticorpos através do tratamento extracorpóreo do sangue do paciente, seja por troca do plasma ou por eliminação seletiva do auto-anticorpo (MALCHESKY *et al.*, 1993).

A plasmaferese convencional ou a troca de plasma tem sido muito praticada em uso clínico, porém alguns componentes do plasma do doador podem ser a causa de alergias, hipocalcemias, infecções virais e outras complicações ao

paciente. Esses problemas têm levado a estudos intensos nesta área e os trabalhos conjuntos entre pesquisadores e médicos têm mostrado a potencialidade da terapia de adsorção seletiva de auto-anticorpos como adjuvante à administração de drogas imunossupressoras (YAMAZAKI *et al.*, 1989; IKONOMOV *et al.*, 1992; BERTA *et al.*, 1994; WIESENHUTTER *et al.*, 1994; GADDIS *et al.*, 1997). A vantagem dos métodos de adsorção seletiva consiste na remoção exclusiva da substância causadora dos sintomas da doença, através da interação específica entre o ligante imobilizado em uma matriz sólida e a proteína patogênica, possibilitando uma maior eficiência no tratamento, sem a necessidade de administração de fluidos de reposição ao paciente (albumina ou plasma de indivíduos sadios).

Entre os ligantes mais utilizados *in vivo* estão a proteína A e os aminoácidos fenilalanina e triptofano. No entanto, esses ligantes apresentam várias desvantagens, tais como a não adsorção da subclasse IgG₃ pela proteína A, a adsorção de fibrinogênio pelo triptofano, tornando seu uso limitado, e a menor adsorção de auto-anticorpos pela fenilalanina quando comparada aos outros ligantes citados (SCHNEIDER, 1998). Um outro ligante ainda em estudo, que mostrou a possibilidade de seu emprego no tratamento extracorpóreo é o aminoácido histidina imobilizado em membranas de álcool poli etileno vinílico (BUENO *et al.*, 1995a, 1995b, 1996; VENTURA, 1999; VENTURA *et al.*, 2000, VENTURA *et al.*, 2001). Apesar das vantagens desse ligante em relação à proteína A (alta capacidade, baixa toxicidade em caso de desprendimento do ligante do suporte e afinidade pela subclasse IgG₃ humana), estudos de seletividade, hemocompatibilidade e ensaios *ex vivo* devem ser realizados para comprovar a viabilidade do seu emprego em tratamento extracorpóreo.

Estudos recentes têm mostrado o potencial de utilização de um outro ligante, a proteína L, na purificação de imunoglobulinas e seus fragmentos Fv e Fab (NILSON *et al.*, 1992, NILSON *et al.*, 1993; AKERSTRÖM *et al.*, 1994; KOUKI *et al.*, 1997). Este ligante, possui alta afinidade pela cadeia leve do tipo kappa das imunoglobulinas, ligando-se a IgG, IgM e IgA (BJÖRCK, 1988), apresentando portanto, um diferencial em relação à proteína A, a qual se liga com baixa

afinidade às classes M e A das imunoglobulinas. Uma vez que os auto-anticorpos são em sua maioria imunoglobulinas G, M e A (FERREIRA & ÁVILA, 1996) e que alguns podem apresentar cadeia leve do tipo kappa (VON LANDENBERG *et al.*, 1999), a proteína L é um ligante em potencial, cuja seletividade em relação à auto-anticorpos anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-Sm e anti-dsDNA, ainda não foi determinada: o emprego da proteína L como ligante em tratamento extracorpóreo não foi encontrado na literatura.

Diante destas observações, o estudo da proteína L na remoção de auto-anticorpos, torna-se importante na busca de um sistema altamente seletivo que minimize a remoção indevida de constituintes não patogênicos do organismo do paciente.

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a adsorção de auto-anticorpos e de imunoglobulinas (G, A e M) em gel agarose-proteína L. Para que este objetivo pudesse ser atingido, realizou-se as seguintes etapas:

1 - Seleção de um tampão apropriado a ser utilizado na etapa de adsorção de IgG. Escolheu-se dentre os tampões PBS, Fosfato de sódio, Tris-HCl, Hepes e Mops, aquele que promoveu maior capacidade de adsorção de IgG humana no gel agarose-proteína L em pH próximo a 7,4, que foi o tampão Hepes. Além desse, escolheu-se também o PBS para dar continuidade às próximas etapas do trabalho, devido às suas propriedades mais fisiológicas quando comparadas às dos outros tampões.

2 - Determinação de isotermas de adsorção de IgG à temperatura ambiente, que permitiu obter através do ajuste de parâmetros aos dados experimentais, a constante de dissociação do complexo IgG-proteína L e a capacidade máxima de adsorção (parâmetros importantes para ampliação de escala). Estes ensaios foram conduzidos em modo frontal, com solução de IgG (pureza de aproximadamente 95%) em diversas concentrações e tampões de adsorção PBS e Hepes.

3 - Verificação da seletividade da matriz de afinidade em adsorver IgG, IgA e IgM em presença de outras proteínas presentes no soro. Nestes experimentos utilizou-se soro humano de indivíduos sadios (sem pré-tratamento).

4 - Investigação da seletividade do suporte em relação à remoção e adsorção de auto-anticorpos, empregando “pools” de amostras séricas contendo auto-anticorpos.

5 - Comparação do desempenho do suporte de afinidade agarose-proteína L com dados de literatura de outros adsorventes utilizados para remoção de auto-anticorpos.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são abordados conhecimentos básicos e relevantes para a compreensão desse trabalho. A revisão da literatura é dividida em quatro tópicos: doenças auto-imunes, auto-anticorpos, tratamento das doenças auto-imunes e modelos de isothermas.

2.1 DOENÇAS AUTO-IMUNES

O sistema imune é constituído por vasta rede de moléculas e células, cuja função primária é proteger o organismo contra a invasão de agentes estranhos. Em resposta a esta invasão, moléculas de anticorpos são sintetizadas e secretadas pelas células plasmáticas (derivadas dos linfócitos B) e se associam não covalentemente com a substância estranha, iniciando um processo de eliminação da mesma do organismo (STRYER, 1995).

Entretanto, distúrbios podem ocorrer e desencadear processos auto-imunes, nos quais são produzidos anticorpos capazes de reagir com componentes próprios do indivíduo (ROITT *et al.*, 1999), os auto-anticorpos. Evidências atuais confirmam que estas reações auto-imunes são a causa de certas enfermidades humanas, conhecidas como doenças auto-imunes (COTRAN, 2000).

As doenças auto-imunes formam *espectro* (Figura 2.1) onde, em um dos extremos, estão os distúrbios cujos auto-anticorpos são dirigidos contra um único órgão ou tecido, gerando portanto lesão tecidual localizada (órgão-específicas). Um exemplo clássico é o diabetes mellitus insulina-dependente, no qual os anticorpos apresentam maior grau de afinidade para as células β das ilhotas pancreáticas. No

outro extremo do *espectro* está o lupus eritematoso sistêmico (LES), no qual uma variedade de anticorpos dirigidos contra o DNA, plaquetas, hemácias e complexos proteína-fosfolípido, resultam em lesões difusas em todo o corpo (órgão inespecíficas ou sistêmicas) (COTRAN, 2000).

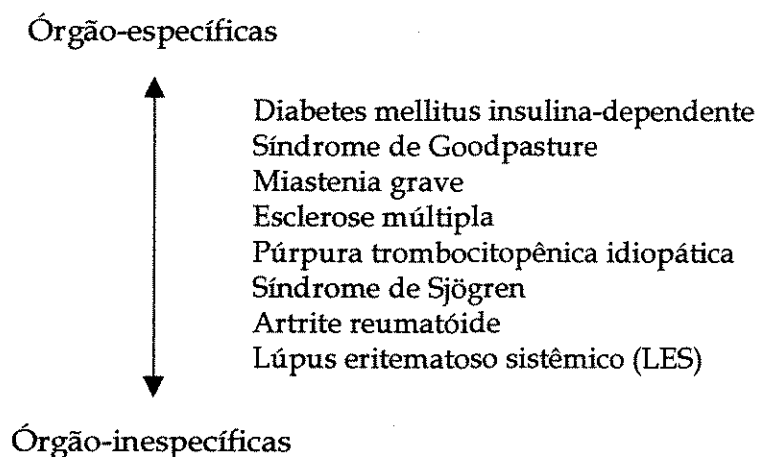


Figura 2.1: Espectro de algumas doenças auto-imunes (adaptado de ROITT *et al.*, 1999).

Para uma maior compreensão das doenças auto-imunes é necessário um estudo mais detalhado sobre os agentes responsáveis pelo seu desencadeamento, os auto-anticorpos.

2.2 AUTO-ANTICORPOS

Os anticorpos e auto-anticorpos são imunoglobulinas, ou seja, glicoproteínas constituídas de 82 a 96% de proteínas e 18 a 4% de carboidratos. Basicamente, cada molécula de imunoglobulina é composta de duas cadeias pesadas idênticas (H) e duas cadeias leves idênticas (L), unidas por ligações dissulfeto (Figura 2.2). As cadeias pesadas têm uma massa molecular de 50 a 70 kDa e são estruturalmente distintas para cada classe ou subclasse, enquanto que as cadeias leves possuem uma massa molecular em torno de 23 kDa e são comuns a todas as classes (ROITT *et al.*, 1999). O terminal amino (porção N terminal) é

caracterizado por uma composição de aminoácidos altamente variável nas cadeias leve e pesada, que são referidas como V_H e V_L . A parte constante da cadeia leve é chamada C_L e a região constante da cadeia pesada é dividida em três partes C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} . Funcionalmente, as regiões V estão envolvidas na ligação com os antígenos e as regiões C estão envolvidas em diferentes atividades biológicas, tais como ligação a complemento, passagem placentária e ligação a membranas celulares (VLUG & REMORTEL, 1989).

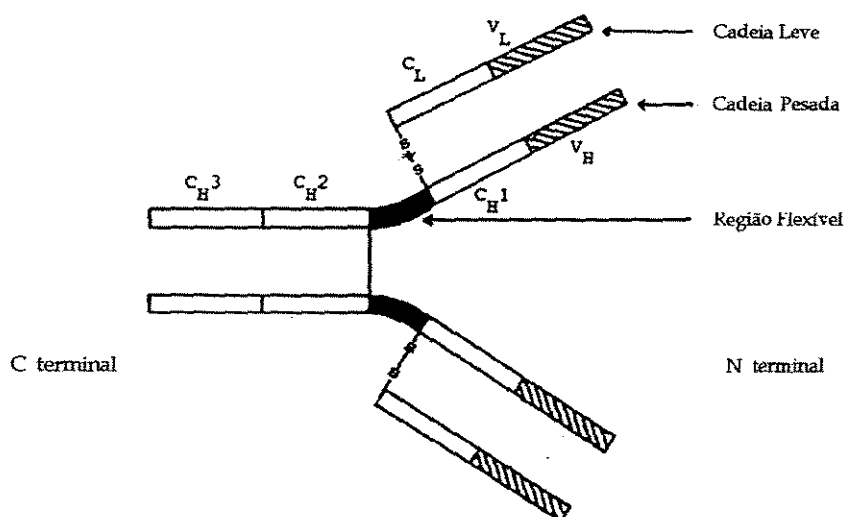


Figura 2.2: Estrutura básica de uma molécula de imunoglobulina. C: região constante; V: região variável; L: cadeia leve; H: cadeia pesada (adaptado de VLUG & REMORTEL, 1989).

O tratamento das imunoglobulinas com a enzima proteolítica papaína, resulta na clivagem de sua molécula na região flexível obtendo-se como produto três fragmentos. Dois idênticos, denominados Fab, ligam-se ao antígeno com afinidade semelhante à encontrada para a molécula intacta (DEVLIN, 1997). O outro fragmento denominado Fc é o local de ligação de complementos e receptores e varia conforme a classe de Ig (VLUG & REMORTEL, 1989). As cadeias leves, que fazem parte da região Fab, podem ser do tipo kappa (κ) ou lambda (λ) (aproximadamente 70% das imunoglobulinas humanas apresentam cadeia κ) (MURPHY *et al.*, 1996).

As classes e subclasses de uma molécula de imunoglobulina são determinadas por suas cadeias pesadas. As estruturas dessas cadeias diferem-se na sequência de aminoácidos, no comprimento das cadeias, nas cargas elétricas e no conteúdo de carboidratos. São conhecidas cinco classes, com diferentes funções biológicas (ROITT *et al.*, 1999):

IgG: contribui para 70 a 75% do total de imunoglobulinas, normalmente produzida nos últimos estágios da resposta imune (massa molecular em torno de 150 kDa);

IgM: contribui para aproximadamente 10% do total de imunoglobulinas e atua no início da resposta imune (massa molecular próxima de 900 kDa);

IgA: representa entre 15 a 20% do total de imunoglobulinas e atua no sistema de defesa do organismo contra infecções locais (massa molecular de 160 kDa);

IgD: perfaz menos de 1% do total de imunoglobulinas plasmáticas. Pode ter um papel na diferenciação dos linfócitos desafiados por antígenos (massa molecular próxima de 180 kDa);

IgE: presente em quantidades ínfimas no soro, pode estar associada a reações alérgicas (massa molecular de 190 kDa);

IgG é encontrada em seres humanos em quatro subclasses (IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄) e IgA em duas subclasses (IgA₁ e IgA₂) (VLUG & REMORTEL, 1989).

Os auto-anticorpos produzidos durante a resposta imune pertencem, principalmente, às classes de imunoglobulinas G, M e A (FERREIRA & ÁVILA, 1996) e alguns pesquisadores têm identificado a predominância das subclasses IgG₁ e IgG₃ nas doenças auto-imunes sistêmicas (MARAN *et al.*, 1997).

O indivíduo acometido por alguma doença auto-imune possui em seu soro um ou mais tipos de auto-anticorpos. Serão descritos a seguir, alguns dos auto-anticorpos presentes nos “pools” de soros do banco de soros do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP:

Anticorpos anti-DNA: os anticorpos anti-DNA são duas populações de auto-anticorpos: uma dirigida contra o DNA de dupla cadeia (dsDNA) ou DNA nativo e outra contra o DNA de cadeia única (ssDNA). O anti-dsDNA é o único auto-anticorpo claramente implicado na patogênese de LES com formação de imunocomplexos, deposição renal e inflamação local. Dentre os pacientes com LES em atividade, 70% são positivos para anti-dsDNA (FERREIRA & ÁVILA, 1996).

Anticorpos anti-Sm: o alvo dos anticorpos anti-Sm é o antígeno Sm que é um complexo constituído por diferentes proteínas associadas a pequenos RNAs nucleares. Esse auto-anticorpo está presente quase que exclusivamente em pacientes com LES, embora sua frequência nessa doença seja de apenas 15 a 30% (LAHITA, 1992).

Anticorpos anti-SS-A/Ro e anti-SS-B/La: há duas classes de auto-anticorpos anti-nucleares presentes em pacientes com LES que também estão relacionadas à auto-anticorpos anti-nucleares presentes em pacientes com síndrome de Sjögren. Os dois antígenos foram chamados SS-A e SS-B por Alspaugh e Tan, por terem precipitado com o soro de pacientes com síndrome de Sjögren. Outro grupo de investigadores detectou que SS-A era idêntico ao Ro, descrito em 1974 por Mattioli e Reichlin e foi mostrado que SS-B era idêntico ao La (LAHITA, 1992).

O antígeno SS-A/Ro tem sido descrito como uma proteína de 60 kDa que pode estar associada com o RNA, variando de 80 a 150 kDa. Os anticorpos anti-SS-A/Ro ocorrem em 96% dos pacientes com síndrome de Sjögren, 5 a 8% dos pacientes com doenças do tecido conectivo e 62% dos pacientes com LES. Os anticorpos anti-SS-B/La ocorrem em 40% dos pacientes com síndrome de Sjögren e em 15% dos pacientes com LES (LAHITA, 1992).

2.3 TRATAMENTO DAS DOENÇAS AUTO-IMUNES

O tratamento convencional das doenças auto-imunes sistêmicas é feito através da administração de medicamentos principalmente corticosteróides e

imunossupressores (ROITT *et al.*, 1999). Entretanto, o risco da utilização prolongada dessas drogas está nos efeitos colaterais que essas podem provocar, tais como depressão da medula óssea, distúrbios gastrintestinais e esterilidade em homens e mulheres (FUDENBERG *et al.*, 1980), além de poderem causar predisposição ao câncer. Esse tratamento controla mas não elimina a doença. Devido a esses inconvenientes, esses medicamentos são geralmente administrados nas formas mais graves e evoluídas da doença (REVILLARD, 1994).

Para tratar a fase aguda da doença, existem dois métodos alternativos para a remoção dos auto-anticorpos do organismo, a partir de um tratamento extracorpóreo do sangue do paciente: a troca de plasma ou a remoção seletiva do auto-anticorpo (MALCHESKY *et al.*, 1993).

Durante a troca de plasma (plasmaferese), todo o plasma do paciente é substituído pelo plasma de um indivíduo sadio. Através dessa técnica, os ativadores e mediadores auto-imunes, que são os antígenos, anticorpos e complexos imunes, são removidos da circulação sanguínea (MALCHESKY *et al.*, 1993), sendo considerado um método não-seletivo e não-específico (RICHTER *et al.*, 1997). Como o plasma é totalmente substituído pelo plasma do doador, proteínas estranhas são transferidas ao paciente, podendo causar alergias, infecções virais como hepatite, AIDS, entre outras complicações (MALCHESKY *et al.*, 1993).

Na remoção seletiva do auto-anticorpo do plasma, apenas a proteína de interesse (auto-anticorpo) é eliminada e assim o restante das proteínas do sangue é retornado ao paciente sem qualquer modificação, evitando a perda dos componentes essenciais do plasma e eliminando a necessidade de sua reposição.

Princípio do tratamento extracorpóreo por adsorção seletiva de auto-anticorpo

Através da circulação extracorpórea, o sangue é retirado do paciente e em seguida, filtrado ou centrifugado para que ocorra a separação entre as células sanguíneas e o plasma. As células retornam imediatamente ao paciente e o plasma é posteriormente tratado através de adsorção seletiva em colunas contendo ligantes de afinidade imobilizados. A proteína de interesse é adsorvida no ligante, enquanto que as moléculas não adsorvidas retornam ao paciente, conforme esquematizado na Figura 2.3.

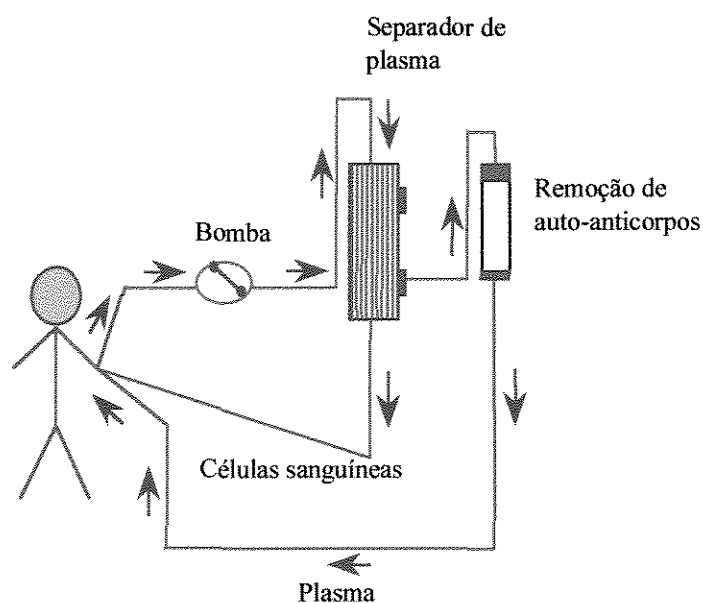


Figura 2.3: Princípio do tratamento extracorpóreo por adsorção seletiva de auto-anticorpo (adaptado de VENTURA, 1999).

Os requisitos para o desenvolvimento de adsorventes de afinidade visando a aplicação em tratamento extracorpóreo, devem levar em consideração o equilíbrio biológico do plasma, um fluido altamente complexo. O suporte ou membrana selecionados, além de possuírem uma alta capacidade e seletividade pela proteína de interesse, devem ser biocompatíveis. O contato da superfície do adsorvente com o plasma, não pode ativar a cascata de coagulação ou o sistema

complemento, nem contribuir para a geração de atividade proteolítica de enzimas dos sistemas inflamatório e hemostático. Isso é essencial para evitar os possíveis efeitos colaterais provocados pelo plasma tratado retornado ao paciente. Além disso, o sistema de adsorção deve apresentar uma alta estabilidade para evitar a perda indesejável do ligante, um fenômeno crítico quando o tratamento é feito em pacientes com um sistema hemostático desequilibrado. O sistema de afinidade também deve ser resistente aos procedimentos de higiene e limpeza, para que a reutilização do mesmo não seja comprometida. Portanto, embora o princípio de bioafinidade seja muito atrativo, o desenvolvimento de sistemas de afinidade deve levar em consideração a especificidade do ligante, a toxicidade, o possível desprendimento da matriz e o custo, buscando maximizar a pureza, o rendimento e a economia (BURNOUF *et al.*, 1998).

Dois tipos de ligantes de afinidade são empregados nos processos de adsorção seletiva: os bioespecíficos e os pseudobioespecíficos (BURNOUF *et al.*, 1998). Os ligantes pseudobioespecíficos, tais como, os aminoácidos fenilalanina, triptofano e histidina são estáveis e de baixo custo, entretanto apresentam uma especificidade menor do que os bioespecíficos. Estes últimos, geralmente são macromoléculas biológicas como anticorpos monoclonais, DNA, proteína A e proteína G, com alta especificidade pela molécula de interesse. No entanto, são frágeis e tóxicos no caso de desprendimento da matriz.

Dentre os ligantes de afinidade empregados na remoção seletiva de auto-anticorpos do plasma humano, os mais utilizados clinicamente são o triptofano, a fenilalanina e a proteína A (IKONOMOV *et al.*, 1992).

O aminoácido triptofano imobilizado em gel de álcool polivinílico foi utilizado na remoção de auto-anticorpos em pacientes com miastenia grave (YAMAZAKI *et al.*, 1989) e o aminoácido fenilalanina, também imobilizado na mesma matriz, foi utilizado no tratamento de pacientes com lupus eritematoso sistêmico (SCHNEIDER *et al.*, 1990) e com esclerose múltipla (YAMAZAKI *et al.*, 1989). Em comparação com a fenilalanina, o triptofano apresenta uma afinidade maior pelos anticorpos anti-acetilcolina e pela IgG, mas seu uso é limitado por

adsorver fibrinogênio. Nenhuma dessas colunas é regenerável, não podendo ser reutilizadas em outras seções extracorpóreas (SCHNEIDER, 1998).

A proteína A secretada pela maioria das linhagens de bactérias *Staphylococcus aureus*, possui alta afinidade pelas subclasses 1, 2 e 4 das imunoglobulinas, ligando-se à região Fc das mesmas. Também se liga com uma menor afinidade ao fragmento F(ab')₂ da IgG humana, IgM, IgA e IgE (BOYLE & REIS, 1987). Colunas com proteína A imobilizada foram aprovadas pela "Food and Drug Administration" (EUA) para o uso na remoção de auto-anticorpos do plasma de pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática (GUTHRIE & ORAL, 1989; MUROI *et al.*, 1989) e têm mostrado um resultado clínico favorável (BALINT *et al.*, 1991; SNYDER *et al.*, 1992).

A terapia de imunoadsorção com proteína A como ligante, também está sendo investigada na síndrome Guillain-Barré, lupus eritematoso sistêmico e miastenia grave (BALINT *et al.*, 1995), apresentando situações clínicas favoráveis em pacientes com LES (PALMER *et al.*, 1991) e se mostrando uma técnica eficaz em miastenia grave (BERTA *et al.*, 1994). Entretanto, o seu benefício é questionável, uma vez que esta proteína apresenta problemas de toxicidade se desprendida da matriz, podendo ocasionar sérios efeitos colaterais como vômitos, febres, hipertensão, hipotensão e dispnéia (ARBISER *et al.*, 1995). Além disso, a não adsorção da subclasse IgG₃ (LANGONE, 1982) resulta em uma grande desvantagem, uma vez que a maioria dos auto-anticorpos presentes em doenças sistêmicas são do tipo IgG₁ e IgG₃ (MARAN *et al.*, 1997).

Um outro ligante bioespecífico que possui alta afinidade pela parte Fc de imunoglobulinas, a proteína G (isolada das linhagens do grupo G *Streptococcal*), interage com a subclasse IgG₃ humana, a qual não adsorve em proteína A (MANDARO *et al.*, 1987). As classes IgM, IgA e IgD não adsorvem em proteína G, indicando uma seletiva reatividade com IgG em contraste com a proteína A (BJÖRCK & KRONVALL, 1984; AKERSTRÖM *et al.*, 1985; BOYLE & REIS, 1987).

BAROCCI & NOCERA (1993), compararam os suportes Sepharose-proteína A e Sepharose-proteína G na remoção *in vitro* de auto-anticorpos do tipo

IgG, de amostras séricas de pacientes com insuficiência renal e a Sepharose-proteína G mostrou-se mais eficiente. No entanto, este suporte ainda não foi testado *in vivo*.

Um outro ligante que mostrou a possibilidade de seu emprego no tratamento extracorpóreo, o aminoácido histidina, foi imobilizado em membranas de álcool poli etileno vinílico - His-PEVA (BUENO *et al.*, 1995a, 1995b, 1996). Estudos experimentais *in vitro* foram efetuados para avaliar a remoção de anticorpos anti-fosfolípidos (DARNIGE *et al.*, 1999), anti-dsDNA, anti-SS-A/Ro, anti-RNP, anti-Sm, anti-Sm/RNP e anti-cardiolipina (VENTURA, 1999; VENTURA *et al.*, 2000; VENTURA *et al.*, 2001) a partir do soro de pacientes com doenças auto-imunes, demonstrando que estes auto-anticorpos foram retidos em His-PEVA. Apesar das vantagens desse ligante em relação à proteína A (alta capacidade, baixa toxicidade em caso de desprendimento do ligante do suporte e afinidade pela subclasse 3 de IgG humana), estudos de seletividade, hemocompatibilidade e ensaios *ex vivo* ainda precisam ser realizados para comprovar a viabilidade do seu emprego em tratamento extracorpóreo.

Diante das vantagens e desvantagens desses adsorventes já empregados no tratamento extracorpóreo, torna-se necessário o estudo de novos ligantes de afinidade que possam satisfazer as exigências e os requisitos para seu emprego na terapia extracorpórea. Um ligante, que apresenta características de adsorção peculiares, e que já vem sendo estudado com a finalidade de purificação de imunoglobulinas, mas ainda não foi investigado para aplicação em tratamento extracorpóreo é a proteína L.

Ligante de afinidade proteína L

A proteína L, isolada da bactéria *Peptostreptococcus magnus*, liga-se especificamente à região variável da cadeia leve de imunoglobulinas do tipo kappa, sem interferir no sítio de ligação antígeno-anticorpo (NILSON *et al.*, 1993). Esta proteína foi identificada em 1985 por Myhre & Esntell e desde então, vários

pesquisadores têm estudado o seu emprego como ligante em cromatografia de afinidade visando a purificação de imunoglobulinas e seus fragmentos Fv e Fab (MYHRE & ESNTELL, 1985; NILSON *et al.*, 1993; AKERSTRÖM *et al.*, 1994; KOUKI *et al.*, 1997).

Em trabalhos anteriores realizados pela equipe de Nilson, foi demonstrado que a proteína L liga-se predominantemente a imunoglobulinas que apresentam cadeias leves do tipo kappa (kI, kIII e kIV) (NILSON *et al.*, 1992). Uma vez que no soro humano aproximadamente 70% das imunoglobulinas apresentam cadeias leves deste tipo, é possível adsorver neste gel de afinidade, até 70% do total de imunoglobulinas do soro ou do plasma humano em uma única etapa. Estudos realizados com fragmentos Fv de IgG humana mostraram que estes são adsorvidos em proteína L imobilizada em Sepharose, a baixos valores de força iônica (tampão PBS, pH 7,4) com afinidade mais alta (K_d igual a $1,2 \times 10^{-10}$ M) comparativamente à proteína A (K_d igual a $1,3 \times 10^{-9}$ M) (AKERSTRÖM *et al.*, 1994). Estas proteínas podem ser dessorvidas do gel agarose-proteína L com tampão glicina-HCl a pH 3,0 (KOUKI *et al.*, 1997) ou a pH 2,0 (NILSON *et al.*, 1993), purificando-se imunoglobulinas com alta eficiência mantendo a sua atividade antigênica.

BERRUEX *et al.* (2000) compararam o desempenho das proteínas A, G e L imobilizadas em discos de metacrilato, na adsorção de IgG bovina policlonal e IgG₁ (kappa) recombinante. A proteína G se ligou a ambos os tipos de IgG com a mesma capacidade, enquanto que a proteína A apresentou menor capacidade de adsorção pela IgG bovina e a proteína L se ligou exclusivamente à IgG₁ recombinante, indicando sua alta seletividade. Isotermas de adsorção foram obtidas em modo dinâmico, para a proteína L a vazões de fluxo diferentes (4 e 6 mL/min), e mostraram que a capacidade de adsorção foi apenas 20% maior para a menor vazão testada.

Os resultados obtidos pelos autores citados foram promissores, no entanto, a afinidade das moléculas de imunoglobulinas pelo ligante proteína L ainda não foi completamente elucidada e a especificidade em relação à auto-anticorpos e subclasses ainda não foi determinada.

2.4 MODELOS DE ISOTERMAS

Para se comparar o desempenho de sistemas de afinidade, vários parâmetros devem ser considerados tais como, tipo da matriz de afinidade a ser empregada, a estabilidade da ligação matriz-ligante, a seletividade do suporte, a capacidade máxima de adsorção do sistema (Q_m), bem como a constante cinética de dissociação do complexo molécula de interesse-ligante imobilizado (K_d). Estes dois últimos parâmetros são de grande importância e podem ser determinados através de isotermas de adsorção. A seguir são apresentados dois modelos de isotermas muito utilizados em sistemas de adsorção de proteínas.

Modelo de Langmuir

O modelo clássico de Langmuir descreve o equilíbrio de adsorção da maioria dos sistemas de afinidade. Para a utilização de sua equação (Eq. 2.1), assume-se as seguintes hipóteses: a adsorção é reversível e limitada a uma camada, a superfície interna do sólido é homogênea e apresenta um número finito de sítios ativos, as moléculas adsorvidas não interagem entre si e não há adsorção competitiva (SHARMA & AGARWAL, 2001):

$$Q = \frac{Q_m C_{eq}}{K_d + C_{eq}} \quad (2.1)$$

onde Q é a quantidade de soluto adsorvido por massa ou volume de adsorvente em equilíbrio com a quantidade de soluto não adsorvido em solução (mg/g ou mg/mL), Q_m é a quantidade máxima possível de ser adsorvida, C_{eq} é a concentração de soluto em equilíbrio na solução (mg/mL) e K_d é a constante de dissociação do complexo soluto-adsorvente (M).

Entretanto, em alguns sistemas, nem todas considerações são satisfeitas por causa da grande diferença entre os mecanismos de adsorção de macromoléculas e os mecanismos de adsorção de pequenas moléculas em interfaces. Essas diferenças podem causar principalmente (a) adsorção irreversível, provocada pela adsorção da proteína em múltiplos sítios de ligação, (b) natureza heterogênea da maioria das superfícies sólidas, e (3) cooperatividade (LUO & ANDRADE, 1998).

Para estabelecer a validade da consideração de que sítios independentes estão presentes na superfície do adsorvente, várias transformações da Eq. 2.1 podem ser empregadas, dentre elas a curva de Scatchard (SHARMA & AGARWAL, 2001):

$$\frac{Q}{C_{eq}} = \frac{Q_m}{K_d} - \frac{Q}{K_d} \quad (2.2)$$

O perfil da curva de Q/C_{eq} em função de Q pode indicar se há cooperatividade positiva (curva assintótica ou curva côncava) ou negativa (curva convexa) no processo de adsorção da proteína ao ligante imobilizado, ou se as proteínas adsorvidas não interagem entre si (curva linear).

Modelo de Langmuir-Freundlich

O modelo de Langmuir-Freundlich leva em consideração a heterogeneidade das superfícies (ANDRADE, 1985). A baixas concentrações, a equação se reduz ao modelo de Freundlich ($Q = K_{d(F)} (C_{eq})^n$) e para o caso de superfícies homogêneas, a equação se reduz ao modelo de Langmuir (QUÍÑONES & GUIOCHON, 1998). O modelo de Langmuir-Freundlich é representado pela seguinte equação:

$$Q = \frac{Q_{m(LF)} (C_{eq})^n}{K_{d(LF)} + (C_{eq})^n} \quad (2.3)$$

onde $K_{d(LF)}$ é a constante de dissociação aparente, $Q_{m(LF)}$ é a capacidade máxima de adsorção e n é o expoente de Langmuir-Freundlich.

Por apresentar três parâmetros, esta equação pode representar melhor a natureza heterogênea da adsorção e as interações cooperativas (cooperatividade) (JAMES & DO, 1991; SHARMA & AGARWAL, 2001).

Para sítios independentes (sem interação entre si), o valor de n é igual a 1. Quando n é maior que 1, uma cooperatividade positiva é sugerida, e quando o valor de n está entre 0 e 1, uma cooperatividade negativa é atribuída ao processo de adsorção. O valor de n pode, portanto, ser empregado como um coeficiente empírico, representando o tipo e a extensão da cooperatividade presente nas interações (SHARMA & AGARWAL, 2001).

Existem vários modelos de interações cooperativas, dentre eles, a adsorção cooperativa entre a proteína e a superfície do adsorvente e a adsorção cooperativa entre as proteínas adsorvidas, devido à interação lateral quando a concentração de proteína adsorvida no suporte aumenta. A interação lateral resulta da contribuição de forças coulombianas e de van der Waals. A força resultante pode ser repulsiva ou atrativa. Na Figura 2.4, é apresentado o esquema de três diferentes conformações de proteínas adsorvidas resultantes da interação lateral entre as proteínas adsorvidas e a interação entre a proteína adsorvida e o adsorvente. O mecanismo do processo de mudança conformacional das proteínas adsorvidas é esquematizado na Figura 2.5.

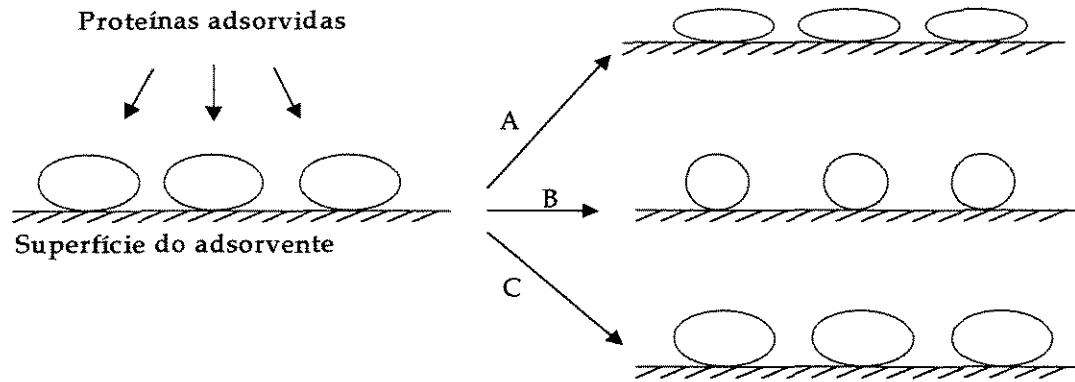


Figura 2.4: Representação esquemática de três diferentes estados de conformação de proteínas adsorvidas: (A) as forças atrativas devido às interações laterais resultam no aumento do grau de cooperatividade; (B) as forças repulsivas devido às interações laterais resultam na diminuição do grau de cooperatividade; (C) a estrutura da proteína é rígida, ou as interações laterais são fracas, não apresentando mudanças significativas na conformação da proteína (adaptado de LUO & ANDRADE, 1998).

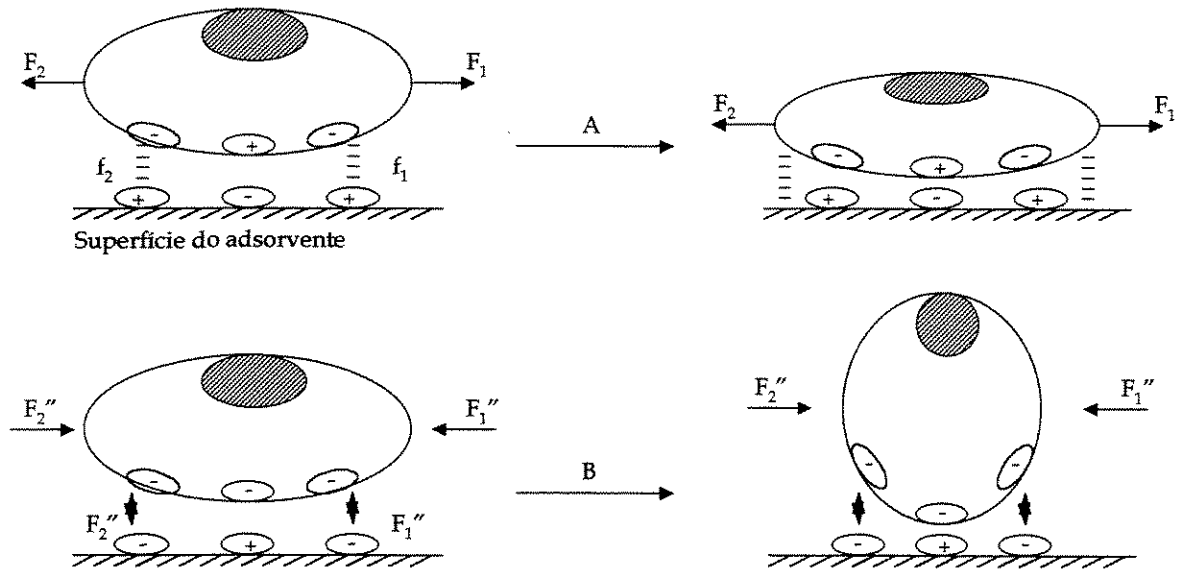


Figura 2.5: Representação esquemática de um possível mecanismo de mudança conformacional de proteínas adsorvidas: (A) F_1 e F_2 são forças atrativas devido às interações laterais quando a concentração de proteínas adsorvidas na superfície do adsorvente aumenta; f_1 e f_2 são forças atrativas entre as cargas da proteína e da superfície do adsorvente. Neste caso, a mudança conformacional leva ao aumento do grau de cooperatividade. (B) F_1'' e F_2'' são forças repulsivas devido às interações laterais quando a concentração de proteínas adsorvidas na superfície do adsorvente aumenta; f_1'' e f_2'' são forças repulsivas entre as cargas da proteína e da superfície do adsorvente. Neste caso, a mudança conformacional leva à diminuição do grau de cooperatividade (adaptado de LUO & ANDRADE, 1998).

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1. Adsorvente

A matriz de afinidade utilizada, agarose-proteína L, foi adquirida da Sigma (EUA). De acordo com o fabricante, esta matriz é constituída de gel de agarose reticulada com epícloridrina (4% agarose) e ativada com brometo de cianogênio. Ainda segundo o fabricante, um fragmento do gene peptostreptococcal contendo quatro domínios de ligação com imunoglobulinas foi expressado em *Escherichia coli* e o peptídeo obtido, proteína L, com massa molecular de 36 kDa, foi purificado como descrito por KASTERN *et al.*, 1992. Após purificação, o ligante proteína L foi imobilizado através do seu grupamento amino N-terminal na matriz de agarose previamente ativada a uma densidade de 1 a 2 mg de proteína por mililitro de gel. Este suporte é estável na faixa de pH de 2 a 11 e a capacidade de adsorção é de 3 a 10 mg de imunoglobulina G humana por mililitro de gel.

3.1.2. Imunoglobulina G, soro humano e “pools” de soros contendo auto-anticorpos

Imunoglobulina G humana pré-purificada (pureza de aproximadamente 95%) foi obtida da Centeon Pharma GmbH (Alemanha) e imunoglobulina G humana intravenosa, pré-purificada (pureza de aproximadamente 91,5%) foi obtida da Gammar (EUA). Estas imunoglobulinas são definidas como IgG pura no decorrer deste trabalho. Soro humano sadio foi doado por Isa Santos Duarte (idade

27 anos). “Pools” de soros contendo auto-anticorpos foram obtidos do banco de soros do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

3.1.3. Reagentes

Para a preparação dos tampões, utilizou-se cloreto de sódio, Fosfato de sódio monobásico e dibásico da LabSynth (Brasil), hidroximetil aminometano (Tris) da Pharmacia (EUA), ácido hidroxietilpiperazinaetanosulfônico (Hepes) e ácido morfolinopropanosulfônico (Mops) da Sigma (EUA). Glicina e azida sódica foram adquiridos da Merck (Alemanha). Todos os demais reagentes utilizados no decorrer deste trabalho foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água ultrapura obtida do equipamento Milli Q (Millipore, EUA).

Para as análises de eletroforese, utilizaram-se tiras de tampão de SDS (“buffer strip”), gel de eletroforese de poliacrilamida (gradiente de concentração 4 a 15%), marcadores de alta e baixa massa molecular obtidos da Pharmacia (EUA) e nitrato de prata da LabSynth (Brasil).

Reagentes e calibradores de IgA, IgG, IgM e albumina foram obtidos da Beckman (EUA) para realização das análises de nefelometria.

A quantificação dos auto-anticorpos: anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-Sm e anti-dsDNA foi realizada por meio do teste ELISA, utilizando-se kits Kallestad Microplate EIA (Sanofi Diagnostics Pasteur, EUA) e leitora para Enzima Imunoensaio (Sanofi Pasteur, LP 35, EUA).

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Preparação das amostras de soro humano

Amostras de sangue humano sadio foram coletadas sem anticoagulante e mantidas à temperatura ambiente em tubos de vidro por duas horas, para permitir a aglutinação. Após a aglutinação, estas amostras foram centrifugadas durante 5 min a 200 x g e o sobrenadante (soro) foi utilizado nos experimentos de adsorção.

3.2.2. Formação de “pools” de soros contendo auto-anticorpos

“Pool” de soros é uma solução formada a partir da mistura de amostras séricas de diferentes indivíduos. Dois “pools”, contendo auto-anticorpos, foram preparados de acordo com a disponibilidade do banco de soros do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. A quantificação dos mesmos é apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Dosagem dos níveis de anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-Sm e anti-dsDNA presentes nos “pools” 1 e 2.

“Pool”	anti-SS-A/Ro (U/mL)	anti-SS-B/La (U/mL)	anti-Sm (U/mL)	anti-dsDNA (U/mL)
1	110,22	21,48	6,79	209,97
2	64,76	29,56	150,12	93,80

3.2.3. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas nos experimentos realizados com IgG humana pura foi feita medindo-se a absorbância a 280 nm em espectrofotômetro (Beckman, DU 60, EUA), assumindo-se coeficiente de extinção 14 para uma

solução 1% de IgG (cubeta com caminho ótico de 1 cm). A concentração de proteína nos experimentos realizados com soro humano sadio foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando albumina de soro bovino como proteína de referência.

3.2.4. Ultrafiltração

A ultrafiltração foi realizada para concentrar as frações de lavagem e de eluição obtidas a partir das cromatografias com soro humano sadio. As frações foram concentradas em Centricon modelo 10 (Millipore, EUA), utilizando-se uma centrífuga (HITACHI modelo Himac CF-15D, Japão) a 2200 x g e a 8 °C.

3.2.5. Eletroforese SDS-PAGE

Com as frações de injeção, lavagem e eluição, obtidas na cromatografia utilizando soro humano sadio, fez-se eletroforese para detectar as proteínas presentes. A eletroforese SDS-PAGE ("Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis") sob condições desnaturantes e não redutoras foi realizada em equipamento Phast-System (Pharmacia, EUA) com gel de poliacrilamida com gradiente de concentração de 4 a 15%. As amostras foram preparadas adicionando-se solução de dodecil sulfato de sódio 10% a elas e em seguida, aquecendo-as a 100 °C por sete minutos. A coloração do gel foi feita com nitrato de prata, de acordo com o protocolo descrito no manual que acompanha o equipamento.

3.2.6. Dosagem das concentrações de IgG, IgA, IgM e albumina

A dosagem das concentrações de IgG, IgA, IgM e albumina presentes no soro humano sadio, nos "pools" de soros e nas amostras de cromatografia foram determinadas por nefelometria, conforme descrito no manual do nefelômetro Array 360 System (Beckman, EUA). O princípio do método baseia-se no espalhamento da luz obtida por partículas (complexos) em suspensão na solução

medida quando esta é submetida a um raio luminoso incidente. Essas partículas são formadas por reação de imunoprecipitação que ocorre quando o anticorpo específico entra em contato com o antígeno, resultando na formação de complexos, conseqüentemente mudando a intensidade da luz. A variação da intensidade do espalhamento de luz é medida pelo nefelômetro e convertida em unidades de concentração (mg/mL).

3.2.7. Dosagem de auto-anticorpos

Pelo teste ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") foi possível quantificar os auto-anticorpos de "pools" de soros e de frações obtidas dos experimentos cromatográficos.

O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo do kit Kallestad Microplate EIA, Sanofi Diagnostics Pasteur (EUA), utilizando-se uma leitora para Enzima Imunoensaio (Sanofi Pasteur, LP 35, EUA). Os seguintes auto-anticorpos foram dosados: anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-Sm e anti-dsDNA.

Princípio do método: as microcubas são recobertas com o antígeno específico de cada kit. Durante a primeira incubação, os auto-anticorpos presentes no soro previamente diluído ligam-se à camada de antígenos. As microcubas são posteriormente lavadas com tampão para remover os componentes do soro que não se ligaram aos antígenos. Na segunda incubação, o conjugado de enzima-anticorpo monoclonal do tipo IgG, liga-se aos auto-anticorpos fixados aos antígenos nas placas. Após nova etapa de lavagem, os auto-anticorpos são identificados mediante incubação com solução de substrato da enzima conjugada. A reação é interrompida por solução bloqueadora, ajustando-se pH apropriado para desenvolvimento de coloração. A quantidade de conjugado reagido é medida em unidades de absorbância. A concentração de auto-anticorpo é estimada por interpolação da curva de calibração realizada com calibradores padronizados. Os resultados são obtidos em unidade internacional de auto-anticorpo (U) por mililitro.

3.2.8. Ensaios cromatográficos

Para os experimentos com IgG pura, o gel agarose-proteína L foi introduzido em uma coluna cromatográfica (10cm x 5mm I.D., Pharmacia, EUA) fornecendo volume de leito de 1,0 mL. Para os experimentos com soro humano sadio e com “pool” de soros contendo auto-anticorpos, a mesma matriz foi empacotada em outra coluna cromatográfica (13cm x 10mm I.D., BioSeptra, EUA) proporcionando volume de leito de 3,4 mL.

Todos os experimentos cromatográficos foram realizados em um sistema de cromatografia de baixa pressão Protech Biochromatography System (Gilson, França). O fluido testado era injetado na coluna por meio de uma bomba peristáltica. A corrente de saída da coluna passava por um monitor de medida de absorvância a 280 nm, cujos sinais eram emitidos continuamente a um registrador, que traçava um cromatograma referente aos dados obtidos. As frações eram recolhidas em tubos de ensaio inseridos no coletor de frações. Um esquema da montagem experimental é mostrado na Figura 3.1. Todos os ensaios cromatográficos foram conduzidos à temperatura ambiente e a uma vazão de 0,5 mL/min, coletando-se frações de 3,0 mL.

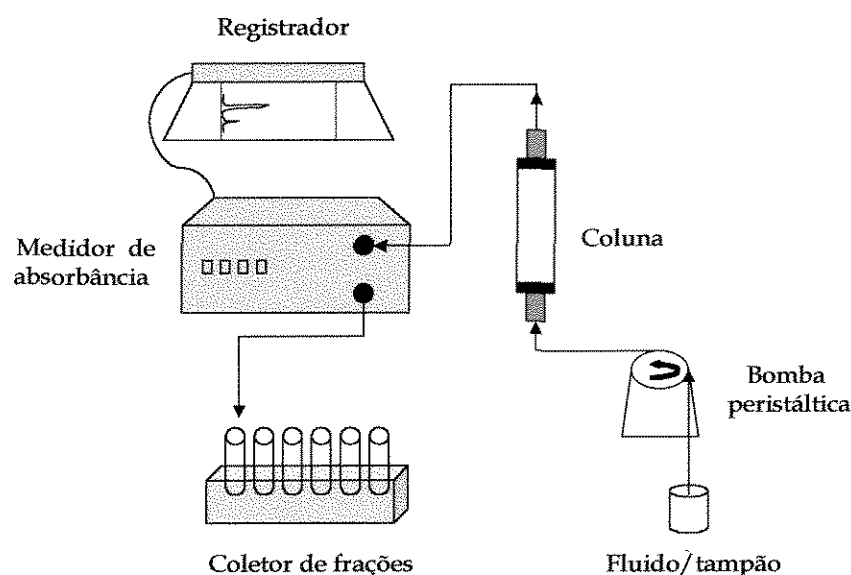


Figura 3.1: Esquema da montagem experimental: sistema de cromatografia de baixa pressão.

Influência do sistema tamponante na adsorção

Nos ensaios realizados para se estudar a influência do sistema tamponante na adsorção de IgG, utilizou-se os seguintes tampões: PBS 10 mM (Fosfato de sódio contendo 0,15 mM de NaCl), Hepes, Tris-HCl, Fosfato de sódio e Mops a 25 mM, em uma faixa de pH de 7,0 a 8,0. Inicialmente, a coluna foi equilibrada com o tampão de adsorção e, em seguida, injetou-se 3,2 mL de uma solução de IgG a uma concentração de 2,5 mg/mL (aproximadamente 8,0 mg). A coluna foi lavada com o tampão de adsorção com a finalidade de eliminar as proteínas não adsorvidas. As proteínas adsorvidas foram eluídas em tampão glicina 0,1 M a pH 3,0. As frações coletadas foram neutralizadas com 0,4 mL de tampão Tris-HCl 1,0 M a pH 8,5. Após a etapa de eluição, fez-se novamente a lavagem da coluna com tampão de adsorção e posteriormente uma lavagem com solução de azida sódica 15 mM, para evitar a proliferação de microrganismos na matriz de afinidade.

Finalizado o experimento, foi realizado o balanço de massa pelo qual avaliou-se a adsorção de IgG na matriz agarose-proteína L, em diferentes tampões e valores de pH.

Obtenção de isotermas de adsorção

Experimentos em modo frontal foram conduzidos com a finalidade de obtenção de isotermas de adsorção para dois sistemas tamponantes: PBS 10 mM e Hepes 25 mM, ambos a pH 7,4. Primeiramente, a coluna foi equilibrada com o respectivo tampão de adsorção. Na etapa seguinte, alimentou-se a coluna com solução de IgG pura a concentrações diferentes para cada experimento (de 0,01 a 3,00 mg de IgG/mL para a isoterma com PBS e 0,02 a 1,56 mg de IgG/mL para a isoterma com Hepes). A alimentação ocorreu até que a capacidade do adsorvente fosse exaurida e a concentração da corrente de saída fosse igual à concentração da alimentação, ou seja, a absorbância do efluente alcançasse um platô. A coluna foi

lavada com o tampão de adsorção com a finalidade de eliminar as proteínas não adsorvidas. A etapa de dessorção foi realizada com tampão glicina 0,1 M a pH 3,0. As frações coletadas foram neutralizadas com tampão Tris-HCl 1,0 M a pH 8,5. Após esta etapa, a coluna foi novamente lavada com o tampão de adsorção e em seguida com solução de azida sódica 15 mM. Mediu-se a absorbância das frações de eluição para determinar a quantidade de proteína adsorvida por volume de adsorvente, Q (mg/mL), de acordo com a Eq. 3.1:

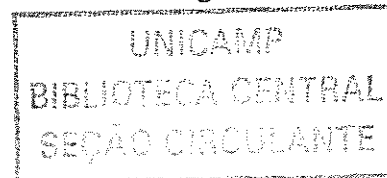
$$Q = \frac{VC}{V_{ads}} \quad (3.1)$$

onde V é o volume total das frações de eluição (mL), C é a concentração de proteínas das frações de eluição (mg/mL) e V_{ads} é o volume de adsorvente empacotado na coluna (mL).

Os dados experimentais obtidos para Q e os valores de concentração da solução de alimentação (C_{eq}) foram utilizados para ajustar os parâmetros dos modelos de Langmuir (Eq. 2.1) e Langmuir-Freundlich (Eq. 2.3) através de regressão não linear (método de Gauss-Marquardt).

Ensaio com soro humano sadio

Inicialmente, a coluna foi equilibrada com o tampão de adsorção PBS 10 mM ou Hepes 25 mM (ambos a pH 7,4) e, em seguida, injetou-se 2,1 mL de soro sadio diluído 1:1 no respectivo tampão de adsorção. A coluna foi lavada com o tampão de adsorção e a eluição foi realizada com tampão glicina 0,1 M, através de um gradiente de grau de pH 3,0 e 2,0. As frações coletadas foram neutralizadas com tampão Tris-HCl 1,0 M a pH 8,5. Após a etapa de eluição, fez-se novamente a lavagem da coluna com tampão de adsorção e posteriormente uma lavagem com solução de azida sódica 15 mM.



Com a amostra de alimentação e as frações de lavagem e eluição obtidas dos experimentos com soro sadio, fez-se uma eletroforese SDS-PAGE e a dosagem dos níveis de IgG, IgA e IgM por nefelometria.

Ensaio com “pools” de soros contendo auto-anticorpos

Inicialmente, a coluna foi equilibrada com tampão de adsorção PBS 10 mM ou Hepes 25 mM (ambos a pH 7,4) e, em seguida, introduziu-se em um reservatório 3,0 mL de “pool” diluído 1:1 no respectivo tampão de adsorção. Essa solução foi recirculada pela coluna durante 40 minutos, simulando-se uma sessão de tratamento extracorpóreo, cujo reservatório representou o paciente (Figura 3.2). Ao término da recirculação, os auto-anticorpos remanescentes na solução do reservatório foram dosados pelo teste ELISA e as imunoglobulinas IgG, IgA, IgM e albumina foram quantificadas por nefelometria. Os resultados obtidos foram expressos em termos da porcentagem de remoção de anticorpos (%R), calculada de acordo com a Eq. 3.2 (IKONOMOV *et al.*, 1992):

$$\%R = \frac{(Q_i - Q_f)}{Q_i} \times 100 \quad (3.2)$$

onde Q_i é a quantidade de auto-anticorpo (U) ou proteína (mg) presentes na solução sérica inicial e Q_f é a quantidade de auto-anticorpo (U) ou proteína (mg) presentes na solução sérica final do reservatório.

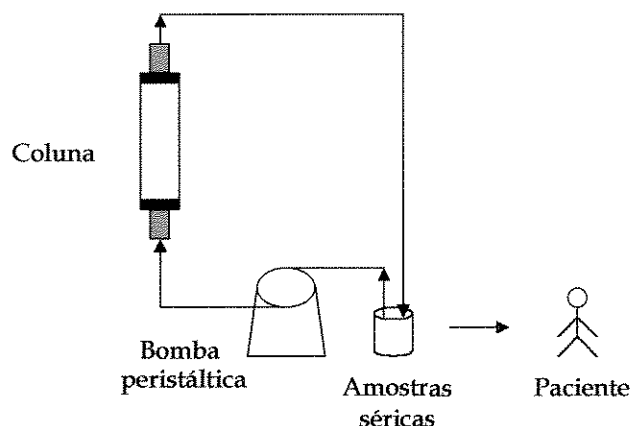


Figura 3.2: Esquema da montagem experimental para remoção de auto-anticorpos em gel agarose-proteína L em circuito fechado.

Após a recirculação, o experimento seguiu o esquema da Figura 3.1. A coluna foi lavada com tampão de adsorção e a eluição foi realizada com tampão glicina 0,1 M a pH 3,0. As frações coletadas foram neutralizadas com tampão Tris-HCl 1,0 M a pH 8,5. Após a etapa de eluição, fez-se novamente a lavagem da coluna com tampão de adsorção e posteriormente uma lavagem com solução de azida sódica 15 mM.

Finalizado o experimento, fez-se a quantificação de auto-anticorpos pelo teste ELISA e de IgG, IgA, IgM e albumina por nefelometria, presentes nas frações de lavagem e eluição. Os resultados obtidos foram expressos em termos da porcentagem de adsorção de anticorpos (%A) no suporte agarose-proteína L, calculada de acordo com a Eq. 3.3:

$$\%A = \frac{Q_{ads}}{Q_i} \times 100 \quad (3.3)$$

onde Q_{ads} é a quantidade de auto-anticorpo (U) ou proteína (mg) eluída e Q_i é a quantidade de auto-anticorpo (U) ou proteína (mg) presentes na solução sérica inicial do reservatório.

3.2.9. Experimentos em frascos agitados

Os experimentos em frascos agitados foram conduzidos como descrito em IKONOMOV *et al.* (1992), utilizando-se tubos de polipropileno de capacidade de 1,5 mL (Figura 3.3). Inicialmente, introduziu-se 100 μ L de adsorvente agarose-proteína L no tubo e, após sedimentação e remoção de excesso de tampão, determinou-se a massa deste adsorvente. Pipetou-se uma quantidade de "pool" de amostras séricas do banco de soros neste tubo, seguindo-se a razão massa de adsorvente por massa de "pool" 1:2. Em seguida, o tubo foi incubado durante 120 minutos a 37°C em um banho com agitação branda. Após incubação, o sobrenadante foi recuperado por centrifugação (Microcentrífuga Microprocessa de Bancada, NT800, Novatécnica, Brasil), à velocidade de 1500 x g e à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Fez-se a quantificação de IgG, IgA, IgM e albumina por nefelometria e dos anticorpos anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-Sm e anti-dsDNA pelo teste ELISA. Os resultados foram comparados com os obtidos por IKONOMOV *et al.* (1992) nos seguintes sistemas de afinidade: Sepharose-proteína A, álcool poli vinílico (PVA)-triptofano, PVA-fenilalanina e sulfato de dextrana.

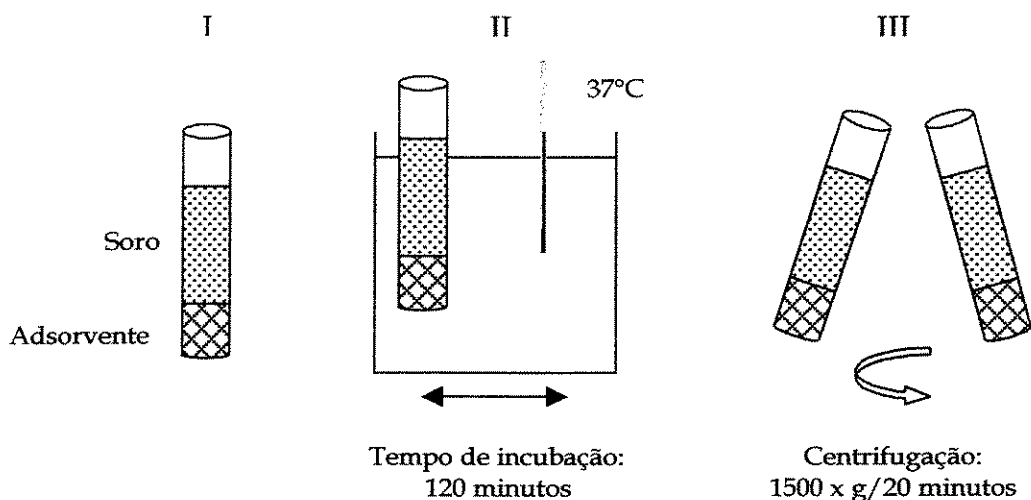


Figura 3.3: Esquema para remoção de auto-anticorpos em tubos agitados (adaptado de IKONOMOV *et al.*, 1992).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 INFLUÊNCIA DO SISTEMA TAMPONANTE NA ADSORÇÃO DE IgG HUMANA EM AGAROSE-PROTEÍNA L

A influência da solução tamponante e do pH na capacidade de adsorver IgG humana no suporte agarose-proteína L foi avaliada para determinar as melhores condições de adsorção. Segundo NILSON *et al.* (1993), KOUKI *et al.* (1997) e BERRUEX *et al.* (2000) imunoglobulina humana com cadeia leve kappa é adsorvida em agarose-proteína L no intervalo de pH entre 7,4 a 7,8. A literatura consultada não relata estudos de adsorção de imunoglobulinas humana empregando soluções tampão diferentes de PBS. Assim, testou-se os sistemas tamponantes PBS a 10 mM e Hepes, Mops, Tris-HCl e Fosfato de sódio a 25 mM, no pH entre 7,0 e 8,0 (limites mais próximos do pH fisiológico). Estes tampões foram escolhidos por apresentarem faixas tamponantes que abrangem este intervalo de pH. Os ensaios cromatográficos foram realizados como descrito no item 3.2.8.

A comparação dos sistemas foi feita com base na quantidade de IgG adsorvida em miligrama de IgG por mililitro de gel empacotado na coluna. Esta comparação foi possível, uma vez que a quantidade de IgG injetada nos ensaios foi praticamente a mesma (aproximadamente 8,0 mg). Os ensaios cromatográficos realizados com os cinco tampões estudados (Hepes, Mops, Tris-HCl, Fosfato de sódio e PBS) apresentaram qualitativamente, o mesmo perfil cromatográfico. Um cromatograma típico destes ensaios é apresentado na Figura 4.1. Neste cromatograma, o primeiro pico representa as proteínas não retidas na matriz de afinidade e o segundo pico, as proteínas adsorvidas e eluídas com o tampão de

dessorção. As quantidades de IgG obtidas em cada etapa são apresentadas na Tabela 4.1.

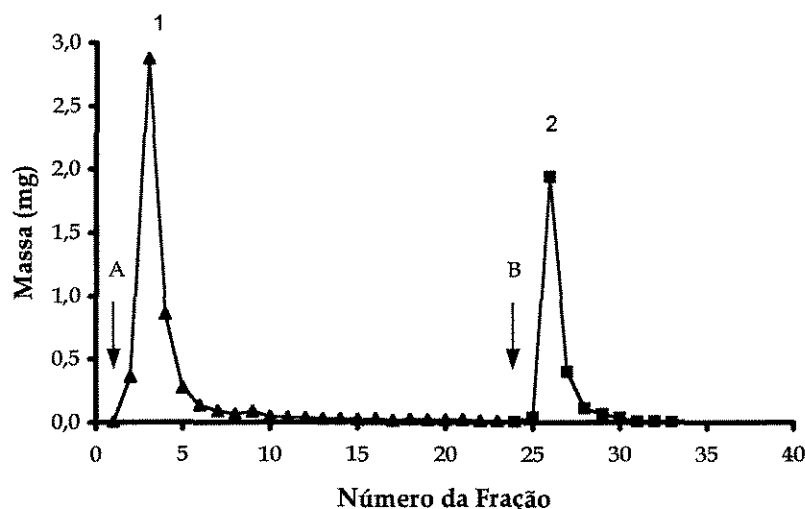


Figura 4.1: Perfil cromatográfico de IgG em gel agarose-proteína L. Injeção de 7,98 mg de IgG humana. Tampão de adsorção, Fosfato de sódio 25 mM a pH 7,5 (▲); tampão de dessorção, glicina 0,1 M a pH 3,0 (■); vazão 0,5 mL/min; volume das frações, 3,0 mL; volume de leito: 0,88 mL. As setas indicam início das etapas de lavagem (A) e dessorção (B). Os números 1 e 2 indicam os picos de proteína obtidos.

Tabela 4.1: Balanço de massa do cromatograma de IgG em agarose-proteína L, utilizando tampão de adsorção Fosfato de sódio a pH 7,5.

Alimentação		Lavagem		Eluição		Recuperação	
mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
7,98	100	5,07	64	2,61	33	7,68	97

Com a finalidade de se comparar os sistemas tamponantes em estudo (Hepes, Mops, Tris-HCl, Fosfato de sódio e PBS), calculou-se a quantidade de IgG adsorvida por volume de gel e também a razão entre quantidade de IgG adsorvida pela quantidade de IgG presente na alimentação, para cada sistema (Tabela 4.2).

O aumento de pH causou diminuição da capacidade de adsorção de IgG em presença de todos os tampões (exceto Tris-HCl), sendo 7,0 o melhor pH de adsorção de IgG no intervalo de valores estudados. Nos ensaios realizados com Hepes, Mops e PBS, a adsorção de IgG diminuiu com o aumento de pH em média 9%, enquanto que em presença de Fosfato de sódio, diminuiu 19%.

Tabela 4.2: Quantidade de IgG adsorvida nos ensaios cromatográficos realizados com Hepes, Mops, Tris-HCl, Fosfato de sódio e PBS, a valores de pH na faixa de 7,0 a 8,0.

pH	Quantidade de IgG adsorvida *									
	Hepes		Mops		Tris-HCl		Fosfato de sódio		PBS	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
7,0	4,91	52	3,97	44	3,50	39	3,95	43	2,67	30
7,5	4,06	45	3,55	39	3,21	36	2,95	33	2,76	30
8,0	3,75	43	2,98	33	3,34	36	2,20	24	2,08	23

* resultados normalizados por volume de gel (coluna continha 0,88 mL de gel em todos os experimentos).

A diminuição da capacidade de adsorção com o aumento de pH, pode estar relacionada com a mudança de cargas dos resíduos de aminoácidos presentes no domínio da proteína L, responsável por sua ligação com a cadeia leve do tipo kappa da IgG (BECKINGHAM *et al.*, 1999).

Observando-se as estruturas dos tampões utilizados neste trabalho na Figura 4.2, nota-se que os tampões zwitteriônicos Hepes e Mops apresentam duas cargas de sinais opostos quando estão em pHs abaixo de seu pK_a , enquanto que os

tampões Tris-HCl e Fosfato de sódio, apresentam uma ou mais cargas de mesmo sinal (somente positiva ou negativa).

A melhor adsorção foi obtida em presença do tampão Hepes a pH 7,0, condição na qual ele se encontra na forma zwitteriônica. Em pHs acima do valor do pK_a , a quantidade de proteína adsorvida na presença desse tampão diminuiu provavelmente devido à desprotonação do nitrogênio do anel piperazina, tornando Hepes carregado negativamente. Apesar do tampão Mops também se apresentar na forma zwitteriônica a pH 7,0, a quantidade de IgG adsorvida na presença do mesmo, foi similar a do tampão Fosfato de sódio. Isto ocorreu provavelmente devido à proximidade do pH 7,0 ao pK_a do tampão Mops (pK_a igual a 7,22). Diante desses resultados, fez-se um experimento utilizando Mops a pH 6,5, buscando-se aumentar o intervalo entre o pH do ensaio e o pK_a do tampão em estudo. A quantidade de IgG adsorvida neste experimento foi 4,62 mg (igual a 51%), valor similar ao do tampão Hepes a pH 7,0.

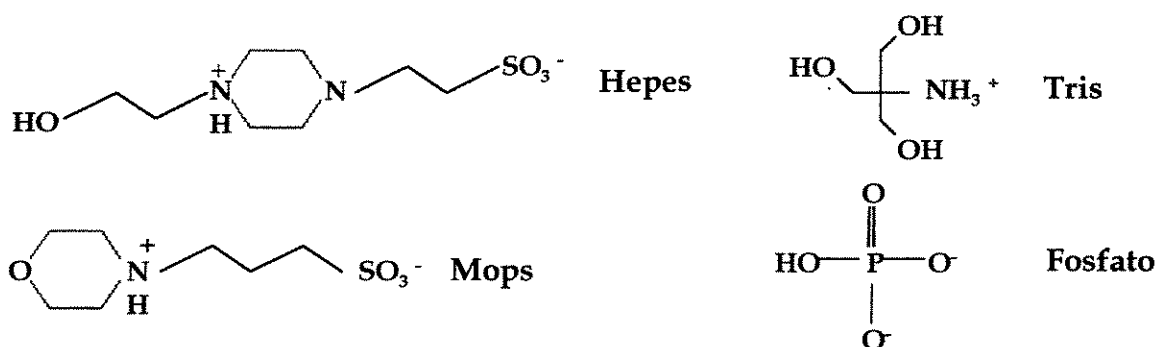


Figura 4.2: Estrutura dos tampões utilizados na etapa de adsorção de IgG em agarose-proteína L: Hepes ($pK_a=7,55$), Mops ($pK_a=7,22$), Tris-HCl ($pK_a=8,30$) e Fosfato de sódio ($pK_{a1}=2,12$; $pK_{a2}=7,21$).

A menor adsorção foi obtida em presença do tampão PBS, o que pode estar relacionado à sua maior força iônica quando comparada a dos demais tampões (Tabela 4.3). Os valores de força iônica dos tampões Hepes, Mops, Tris-HCl e Fosfato de sódio encontram-se na mesma ordem de grandeza, assim suas

respectivas quantidades adsorvidas não variam muito e são superiores a 3,50 mg/mL de gel. Entretanto, para o tampão PBS, o valor da força iônica encontra-se em uma ordem de grandeza superior a dos demais, resultando em uma menor quantidade adsorvida em sua presença (igual a 2,67 mg/mL de gel). Este tampão não seria indicado para processos de purificação de IgG utilizando-se proteína L como ligante, devido à baixa capacidade do adsorvente nestas condições.

Tabela 4.3: Influência da força iônica (I) na quantidade de IgG adsorvida nos ensaios cromatográficos realizados com Hepes, Mops, Tris-HCl, Fosfato de sódio e PBS, a pH 7,0.

Tampão	Força iônica (I*)	Quantidade de IgG adsorvida (mg/mL de gel)
Hepes	0,045	4,91
Mops	0,046	3,97
Tris-HCl	0,010	3,50
Fosfato de sódio	0,028	3,95
PBS	0,190	2,67

* $I = \frac{1}{2} \sum [i] Z_i^2$, onde $[i]$ é a concentração de cada íon i e Z_i é a carga de cada íon i .

Neste trabalho não se testou adsorção de IgG a valores de pH menores do que 7,0, evitando-se assim, valores muito distantes do pH fisiológico.

Diante dos resultados obtidos, selecionou-se os tampões Hepes e PBS para dar continuidade às próximas etapas deste trabalho. Escolheu-se o PBS por causa de suas propriedades mais fisiológicas quando comparadas às dos outros tampões, e o Hepes devido à maior quantidade de proteínas adsorvidas em sua presença. O pH 7,4 foi escolhido por ser próximo ao pH sanguíneo (pH igual a 7,4).

4.2 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

Isotermas de adsorção de IgG em agarose-proteína L foram construídas com a finalidade de determinar a capacidade máxima de adsorção (Q_m) e a constante de dissociação (K_d) do complexo IgG-proteína L, em presença dos tampões PBS e Hepes. Os experimentos foram conduzidos em modo frontal, alimentando-se a coluna com solução de IgG a concentrações diferentes para cada experimento, as quais estavam na faixa de 0,01 a 3,00 mg de IgG/mL, para a isoterma com PBS e 0,02 a 1,56 mg de IgG/mL para a isoterma com Hepes, como descrito no item 3.2.8.

Um cromatograma típico do ensaio em modo frontal é apresentado na Figura 4.3.

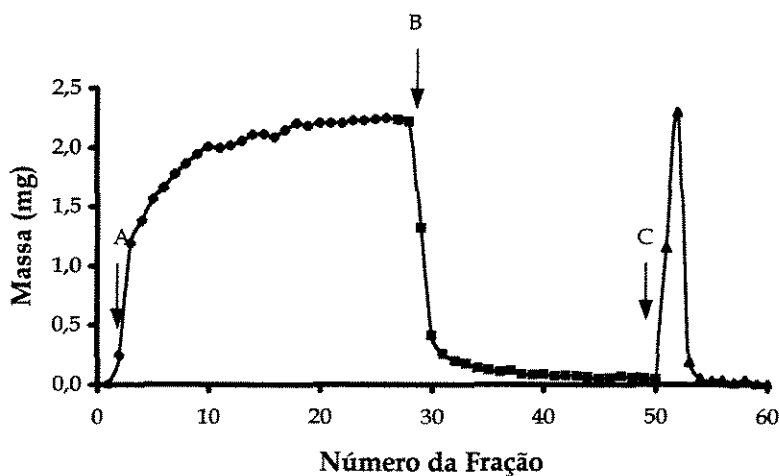


Figura 4.3: Perfil cromatográfico de IgG em gel agarose-proteína L: Alimentação de 99 mL de IgG humana a 0,6 mg/mL (◆), tampão de lavagem, PBS 10 mM a pH 7,4 (■); tampão de dessorção, glicina 0,1 M a pH 3,0 (▲); vazão 0,5 mL/min; volume das frações, 3,0 mL. As setas indicam início das etapas de alimentação (A), lavagem (B) e dessorção (C).

No cromatograma da Figura 4.3, o perfil é caracterizado por um platô, que ocorreu com a saturação da coluna durante a alimentação; um retorno à linha de base durante a lavagem para a remoção de proteínas não retidas e um único pico,

representado pelas proteínas adsorvidas e eluídas com o tampão de dessorção. A quantidade de IgG adsorvida e o balanço de massa para este ensaio são mostrados na Tabela 4.4. A quantidade de proteína presente na “Saturação” representa a massa de proteína que deixa a coluna durante a alimentação, enquanto que a quantidade de proteína presente na “Recuperação” foi calculada somando-se as massas de proteína das etapas de “Saturação”, “Lavagem” e “Eluição”.

Tabela 4.4: Balanço de massa do cromatograma de IgG em agarose-proteína L, cromatografia em modo frontal utilizando tampão de adsorção PBS.

Alimentação		Saturação		Lavagem		Eluição		Recuperação	
mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
59	100	50,4	85,4	5,9	10,1	3,8	6,5	60,2	102

A quantidade de proteína adsorvida por mililitro de adsorvente foi calculada a partir da massa de IgG eluída com o tampão de dessorção, para experimentos realizados a várias concentrações. Com estes dados experimentais, obteve-se as isotermas de adsorção (Figuras 4.4 e 4.5) e ajustou-se os parâmetros do modelo de Langmuir (Eq. 2.1), utilizando o programa computacional Microcal Origin 5.0 (Microcal Software, EUA). A regressão não linear da Eq. 2.1 forneceu os valores de capacidade máxima de adsorção e constante de dissociação do complexo IgG-proteína L, apresentados na Tabela 4.5.

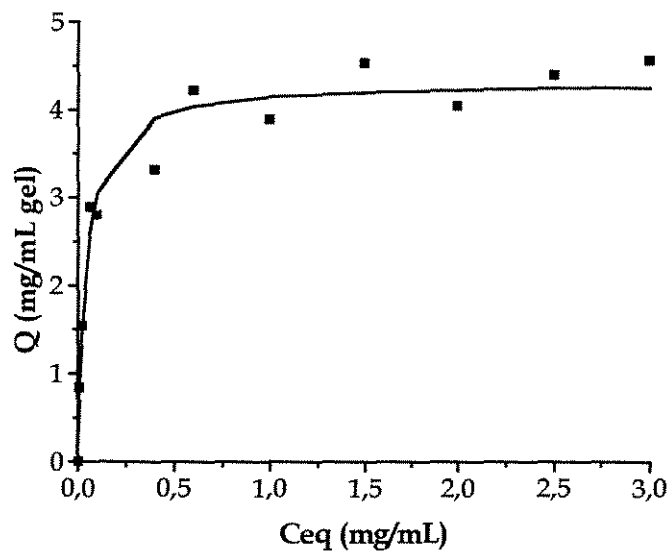


Figura 4.4: Comparação entre os dados experimentais (■) e o ajuste dos parâmetros do modelo de Langmuir (—), para a adsorção de IgG em agarose-proteína L utilizando tampão PBS 10 mM a pH 7,4. Coeficiente de correlação (r) igual a 0,97.

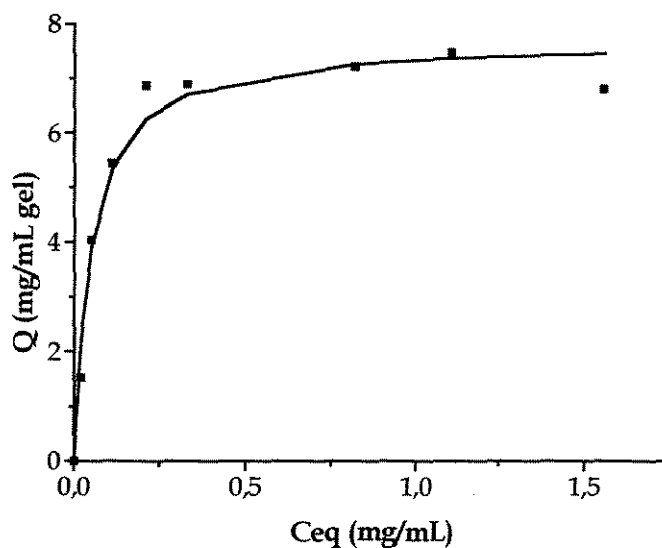


Figura 4.5: Comparação entre os dados experimentais (■) e o ajuste dos parâmetros do modelo de Langmuir (—), para a adsorção de IgG em agarose-proteína L utilizando tampão Hepes 25 mM a pH 7,4. Coeficiente de correlação (r) igual a 0,98.

Tabela 4.5: Parâmetros do modelo de Langmuir obtidos a partir do ajuste aos dados experimentais das isotermas de adsorção de IgG em agarose-proteína L, à temperatura ambiente, na presença de PBS 10 mM e Hepes 25 mM, pH 7,4.

Parâmetros	Tampões	
	PBS	Hepes
Q_m (mg/mL gel)	$4,3 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,3$
K_d (M)	$(2,8 \pm 0,5) \times 10^{-7}$	$(3,2 \pm 0,6) \times 10^{-7}$
coeficiente de correlação	0,97	0,98

A correlação entre os valores observados (dados experimentais) e os estimados pela Eq.2.1, apresentou coeficientes próximos da unidade (iguais a 0,97 e 0,98), justificando o ajuste do modelo de Langmuir aos dados experimentais. Uma vez que hipóteses são assumidas para utilização deste modelo, sugere-se a construção de gráficos de Scatchard (Q/C_{eq} em função de Q) (Eq.2.2) para as isotermas obtidas com PBS (Figura 4.6) e Hepes (Figura 4.7), com a finalidade de se validar estas considerações. O perfil não-linear (r igual a 0,89) observado no gráfico da Figura 4.7, indica a existência de desvios do comportamento Langmuirano.

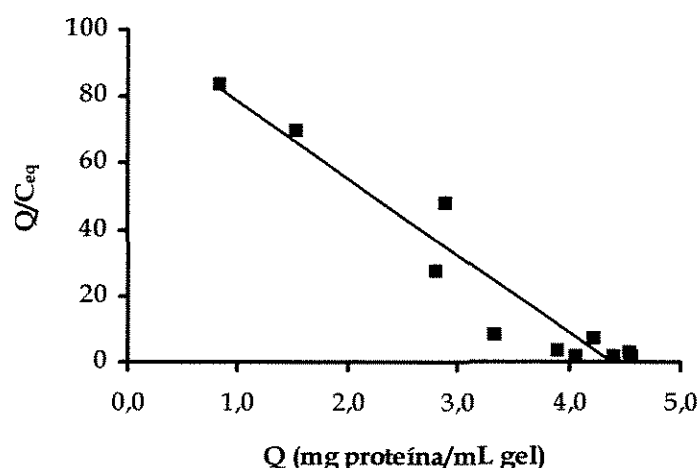


Figura 4.6: Análise de Scatchard referente à linearização da equação do modelo de Langmuir para os dados experimentais de adsorção de IgG em agarose-proteína L utilizando tampão PBS 10 mM a pH 7,4 (dados da Figura 4.4). Coeficiente de correlação da regressão linear (r) igual a 0,96.

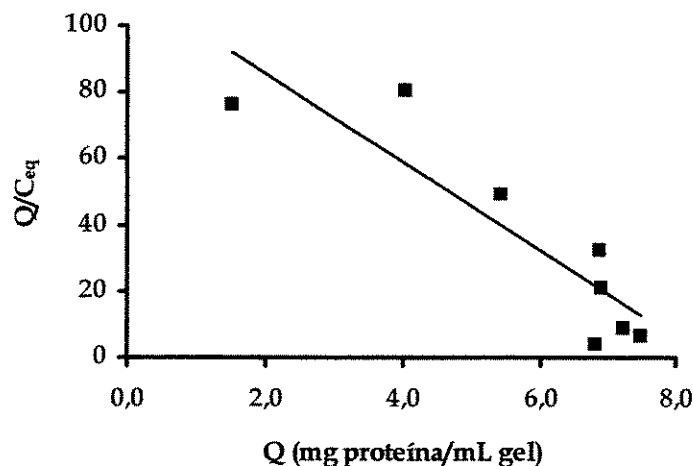


Figura 4.7: Análise de Scatchard referente à linearização da equação do modelo de Langmuir para os dados experimentais de adsorção de IgG em agarose-proteína L utilizando tampão Hepes 25 mM a pH 7,4 (dados da Figura 4.5). Coeficiente de correlação da regressão linear (r) igual a 0,89.

Gráficos de Scatchard têm sido considerados apropriados para elucidar as interações cooperativas (cooperatividade) e a natureza heterogênea da adsorção de proteínas. De acordo com estudos de SHARMA & AGARWAL (2001) se a curva Q/C_{eq} em função de Q for convexa, uma cooperatividade negativa pode ser observada. Se for linear, as interações podem ser independentes, e se a curva Q/C_{eq} em função de Q for assintótica (ou em alguns casos côncava), uma cooperatividade positiva pode existir. Assim, fazendo-se regressão polinomial de segundo grau da curva da Figura 4.7, obtém-se uma curva côncava (Figura 4.8), sugerindo cooperatividade positiva para a isoterma obtida com Hepes. Apesar do coeficiente de correlação obtido no gráfico da Figura 4.6 indicar linearidade, nota-se uma tendência da curva à convexidade (Figura 4.9), sugerindo cooperatividade negativa para a isoterma obtida com PBS.

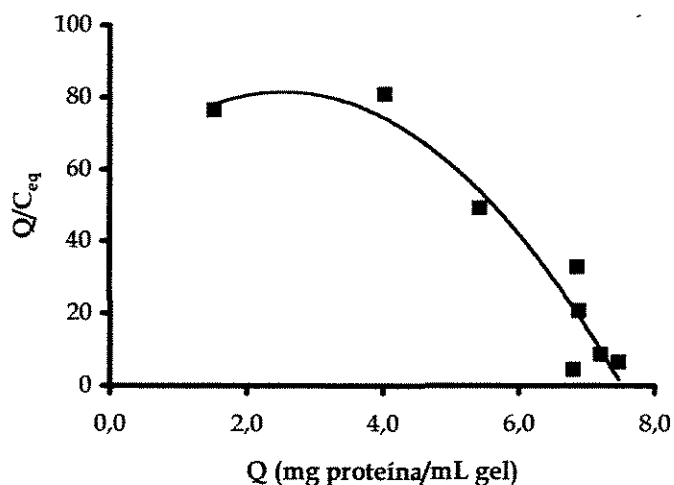


Figura 4.8: Análise de Scatchard referente à linearização da equação do modelo de Langmuir, para os dados experimentais de adsorção de IgG em agarose-proteína L utilizando tampão Hepes 25 mM a pH 7,4 (dados da Figura 4.5). Coeficiente de correlação da regressão polinomial de segunda ordem (r) igual a 0,96.

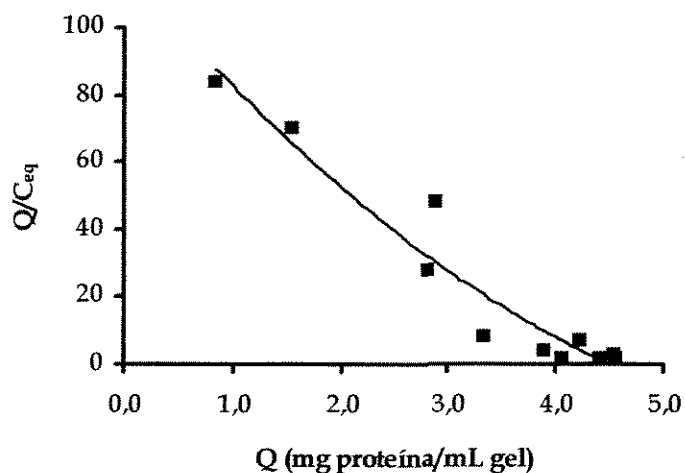


Figura 4.9: Análise de Scatchard referente à linearização da equação do modelo de Langmuir, para os dados experimentais de adsorção de IgG em agarose-proteína L utilizando tampão PBS 10 mM a pH 7,4 (dados da Figura 4.4). Coeficiente de correlação da regressão polinomial de segunda ordem (r) igual a 0,97.

Para confirmar alguns dos desvios do comportamento Langmuirano, tais como a cooperatividade e a heterogeneidade da superfície do sólido, o modelo de Langmuir pode ser combinado ao modelo de Freundlich, resultando na equação Langmuir-Freundlich (Eq. 2.3). As curvas do modelo de Langmuir-Freundlich resultantes dos ajustes dos parâmetros aos dados experimentais das isotermas obtidas com tampões PBS e Hepes são mostradas nas Figuras 4.10 e 4.11, respectivamente, juntamente com os dados experimentais. A regressão não linear da Eq. 2.3 forneceu os valores de capacidade máxima de adsorção e constante de dissociação do complexo IgG-proteína L, apresentados na Tabela 4.6.

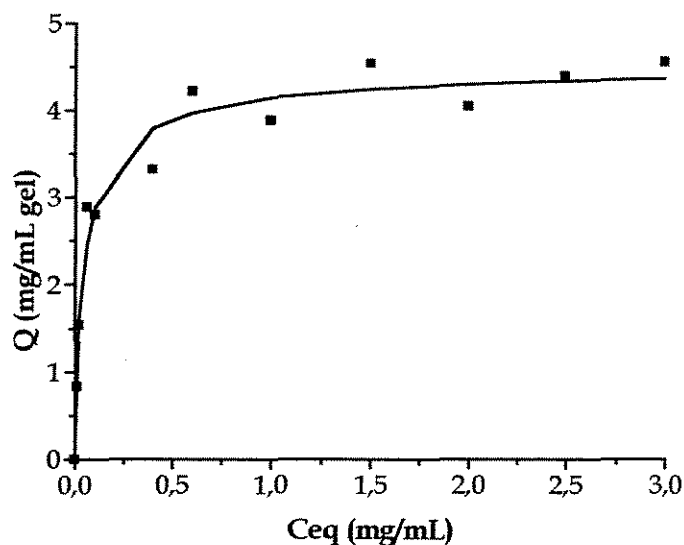


Figura 4.10: Comparação entre os dados experimentais (■) e o ajuste dos parâmetros do modelo de Langmuir-Freundlich (—), para a adsorção de IgG em agarose-proteína L utilizando tampão PBS 10 mM a pH 7,4. Coeficiente de correlação (r) igual a 0,97.

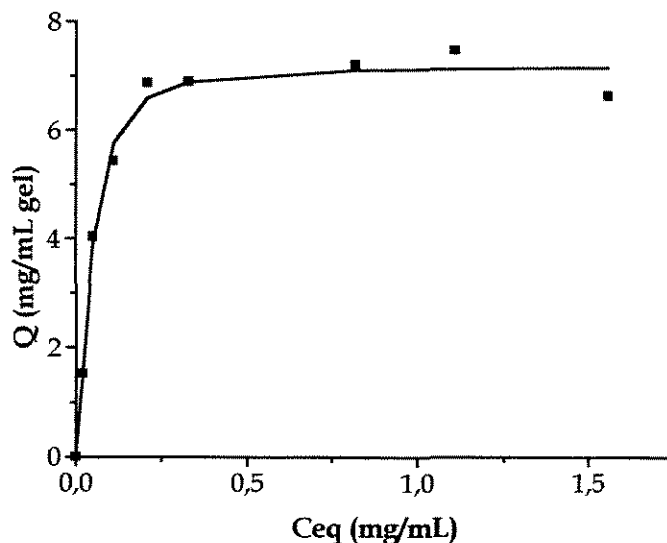


Figura 4.11: Comparação entre os dados experimentais (■) e o ajuste dos parâmetros do modelo de Langmuir-Freundlich (—), para a adsorção de IgG em agarose-proteína L utilizando tampão Hepes 25 mM a pH 7,4. Coeficiente de correlação (r) igual a 0,99.

Tabela 4.6: Parâmetros do modelo de Langmuir-Freundlich obtidos a partir do ajuste aos dados experimentais das isotermas de adsorção de IgG em agarose-proteína L, à temperatura ambiente, na presença de PBS 10 mM e Hepes 25 mM.

Parâmetros	Tampões	
	PBS	Hepes
$Q_{m(LF)}$ (mg/mL gel)	$4,6 \pm 0,3$	$7,2 \pm 0,2$
$K_{d(LF)}$ (M)	$(6,5 \pm 4,4) \times 10^{-7}$	$(5,2 \pm 3,8) \times 10^{-8}$
n	$0,77 \pm 0,18$	$1,6 \pm 0,2$
coeficiente de correlação	0,97	0,99

O ajuste dos parâmetros do modelo de Langmuir-Freundlich aos dados experimentais da isoterma obtida com tampão PBS forneceu um valor de r igual àquele determinado pelo modelo de Langmuir (igual a 0,97), entretanto para a isoterma determinada com tampão Hepes, o melhor ajuste foi obtido para o

modelo de Langmuir-Freundlich (r igual a 0,99). O valor de $n_{(PBS)}$ igual a 0,77 (entre 0 e 1), confirma a cooperatividade negativa atribuída à adsorção em presença de PBS, pela análise de Scatchard. Neste caso, a existência de forças repulsivas devido às interações laterais resulta na diminuição do grau de cooperatividade. O valor de $n_{(Hepes)}$ igual a 1,6 (maior do que 1) confirma a cooperatividade positiva atribuída à adsorção em presença de Hepes, pela análise de Scatchard. A presença de forças atrativas resulta no aumento do grau de cooperatividade.

Os valores de capacidade máxima obtidos neste trabalho (4,3 e 7,7 mg/mL gel para PBS e Hepes, respectivamente) estão dentro da faixa de Q_m fornecida pelo fabricante do adsorvente (3 a 10 mg/mL gel) e são 4,5 a 8,0 vezes maiores do que o valor obtido por BERREUEX *et al.* (2000). A ordem de grandeza de K_d obtida neste trabalho foi de 10^{-7} , enquanto que BERREUEX *et al.* (2000) obtiveram 10^{-8} M e AKERSTRÖM *et al.* (1994) obtiveram 10^{-10} M. Entretanto, esta comparação é feita com ressalvas, uma vez que as condições utilizadas por BERREUEX *et al.* (2000) e AKERSTRÖM *et al.* (1994) foram diferentes. Nos experimentos realizados por BERREUEX *et al.* (2000), o adsorvente empregado foi proteína L imobilizada em discos de metacrilato, o tampão PBS apresentava concentração diferente da utilizada neste trabalho (PBS 50 mM contendo NaCl 120 mM), o tampão de eluição foi HCl 10mM a pH 2,0 e a imunoglobulina utilizada foi IgG recombinante de cadeia leve kappa. Nos experimentos realizados por AKERSTRÖM *et al.* (1994), purificaram-se fragmentos Fv em Sepharose-proteína L, utilizando-se tampão de eluição glicina a pH 2,5 e a constante de afinidade foi determinada por radioimunoensaio.

Os valores de constante de dissociação do complexo IgG-proteína L obtidos na faixa micromolar (K_d iguais a $2,8 \times 10^{-7}$ M e $3,2 \times 10^{-7}$ M para PBS e Hepes, respectivamente), indicam uma alta afinidade, que é típica para ligantes de afinidade bioespecíficos.

4.3 EXPERIMENTOS COM SORO HUMANO SADIO

Os ensaios com soro humano sadio foram realizados com o objetivo de determinar a capacidade e a seletividade do suporte de afinidade agarose-proteína L, em adsorver IgG, IgA e IgM, em presença de outras proteínas existentes no soro. As cromatografias utilizando PBS e Hepes apresentaram qualitativamente o mesmo perfil cromatográfico. Os cromatogramas típicos dos ensaios realizados com estes tampões são mostrados nas Figuras 4.12 e 4.13.

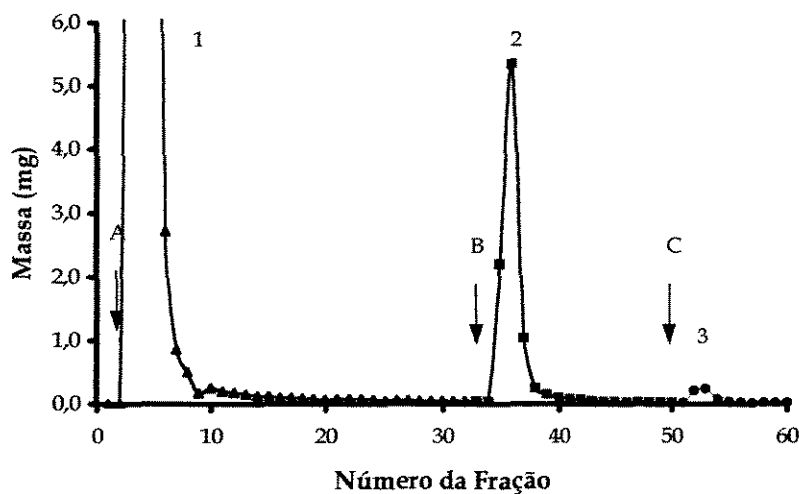


Figura 4.12: Perfil cromatográfico de soro humano sadio em gel agarose-proteína L com tampão PBS. Injeção de 2,1 mL de soro humano sadio diluído 1:1 em tampão de adsorção. Tampão de adsorção, PBS 10 mM a pH 7,4 ($\blacktriangle$); tampões de dessorção, glicina 0,1 M a pH 3,0 ($\blacksquare$) e glicina 0,1 M a pH 2,0 ($\bullet$); vazão 0,5 mL/min; volume das frações, 3,0 mL, volume de leito 3,4 mL. As setas indicam início das etapas de lavagem (A), dessorção a pH 3,0 (B) e pH 2,0 (C). Os números 1 a 3 indicam os picos de proteína obtidos.

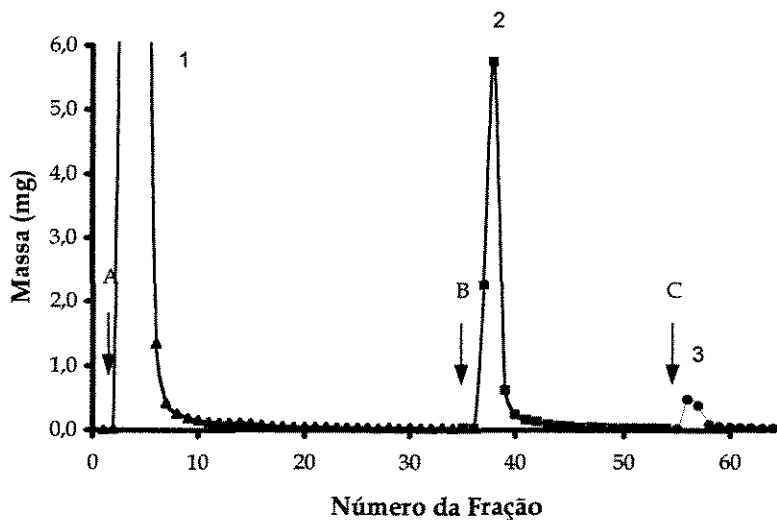


Figura 4.13: Perfil cromatográfico de soro humano sadio em gel agarose-proteína L com tampão Hepes. Injeção de 2,1 mL de soro humano sadio diluído 1:1 em tampão de adsorção. Tampão de adsorção, Hepes 25 mM a pH 7,4 (▲); tampões de dessorção, glicina 0,1 M a pH 3,0 (■) e glicina 0,1 M a pH 2,0 (●); vazão 0,5 mL/min; volume das frações, 3,0 mL, volume de leito 3,4 mL. As setas indicam início das etapas de lavagem (A), dessorção a pH 3,0 (B) e pH 2,0 (C). Os números 1 a 3 indicam os picos de proteína obtidos.

Os perfis dos cromatogramas das Figuras 4.12 e 4.13 são caracterizados por três picos de tamanhos bem diferenciados, mostrando que dentre as proteínas dessorvidas, a maior quantidade se encontra no pico de eluição a pH 3,0. Isto foi confirmado pelo balanço de massa global de ambos os sistemas, apresentado na Tabela 4.7. A quantidade de proteínas retida na matriz agarose-proteína L no experimento com tampão Hepes foi similar ao valor obtido em presença de PBS.

Tabela 4.7: Balanço de massa em relação às proteínas totais do soro humano sadio de cromatografias em coluna contendo agarose-proteína L, utilizando tampões de adsorção PBS e Hepes.

Tampão de adsorção	Alimentação		Lavagem		Eluição a pH 3,0		Eluição a pH 2,0		Recuperação	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
PBS	145	100	137	95	8,1	6	1,3	1	146,4	102
Hepes	145	100	115	79	9,7	7	1,2	1	125,9	87

As frações de injeção, lavagem e eluição foram analisadas através de eletroforese SDS-PAGE sob condições desnaturantes e não redutoras, cujo resultado está apresentado na Figura 4.14.

As faixas 3 e 6, da Figura 4.14, referentes às etapas de lavagem das cromatografias realizadas com PBS e Hepes respectivamente, aparentam ser compostas majoritariamente de impurezas com pouca IgG. Analisando-se as faixas 4 e 7, que correspondem aos picos de eluição a pH 3,0 para as cromatografias realizadas com PBS e Hepes respectivamente, nota-se que ambos os sistemas adsorveram grandes quantidades de IgG, traços de albumina e provavelmente IgM (proteína que ficou retida no início do gel). A presença de mais de uma banda na faixa 2, representa impurezas da IgG humana utilizada neste trabalho (Gammar, EUA).

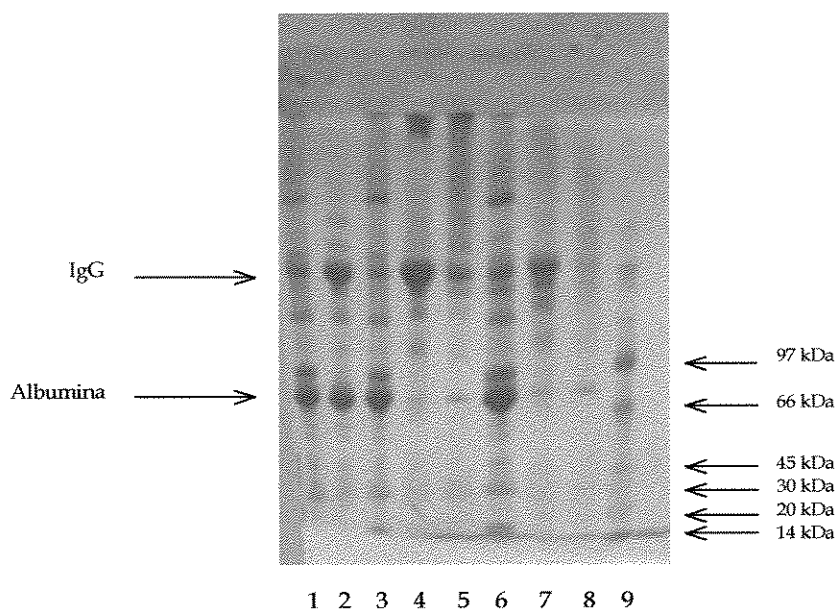


Figura 4.14: Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida gradiente 4 a 15% de cromatografia de soro humano sadio em agarose-proteína L. Revelação com nitrato de prata. Amostras obtidas sob condições desnaturantes e não-redutoras. Faixa 1: soro humano sadio; faixa 2: IgG humana pura. Amostras de cromatografia com tampão de adsorção PBS: faixa 3: fração de lavagem; faixa 4: fração de eluição a pH 3,0; faixa 5: fração de eluição a pH 2,0. Amostras de cromatografia com tampão de adsorção Hepes: faixa 6: fração de lavagem; faixa 7: fração de eluição a pH 3,0; faixa 8: fração de eluição a pH 2,0. Faixa 9: marcadores de massa molecular (fosforilase b, 97 kDa; albumina, 66 kDa; ovalbumina, 45 kDa; anidrase carbônica, 30 kDa; inibidor tripsina, 20,1 kDa e α -lactalbumina, 14,4 kDa).

As frações de injeção, lavagem e eluição das cromatografias realizadas com soro humano sadio, em presença de PBS e Hepes, também foram analisadas por nefelometria para se dosar IgG, IgA e IgM. Os balanços de massa são apresentados nas Tabelas 4.8 e 4.9 para as cromatografias com PBS e Hepes, respectivamente.

Analisando-se os resultados das Tabelas 4.8 e 4.9, observa-se que para ambos os tampões, a maior parte de IgG e IgA adsorvida na matriz foi eluída a pH 3,0, enquanto que IgM apresentou quantidades significativas nas frações de eluição a pH 2,0.

Comparando-se os resultados em relação aos dois sistemas tamponantes, verifica-se que as quantidades de IgG e IgM adsorvidas em presença de tampão

Hepes, superam em aproximadamente 11% os valores obtidos nos experimentos que utilizam PBS. Entretanto, as quantidades de IgA adsorvidas em ambos os sistemas foram iguais (21%).

Tabela 4.8: Balanço de massa para IgG, IgA e IgM, resultante das análises nefelométricas do soro humano sadio e das frações de lavagem e eluição da cromatografia utilizando PBS, com volume de leito igual a 3,4 mL.

Etapa	IgG		IgA		IgM	
	mg	%	mg	%	mg	%
Injeção (soro)	30,5	100	7,8	100	5,2	100
Lavagem	15,8	52	4,8	62	2,5	48
Eluição pH 3,0	6,5	21	1,5	20	1,0	19
Eluição pH 2,0	0,5	1,7	0,1	1,1	0,5	9
Total da eluição	7,0	23	1,6	21	1,5	28
Recuperação	22,8	75	6,4	83	4,0	76

Tabela 4.9: Balanço de massa para IgG, IgA e IgM, resultante das análises nefelométricas do soro humano sadio e das frações de lavagem e eluição da cromatografia utilizando Hepes, com volume de leito igual a 3,4 mL.

Etapa	IgG		IgA		IgM	
	mg	%	mg	%	mg	%
Injeção (soro)	30,5	100	7,8	100	5,2	100
Lavagem	14,6	48	5,0	64	2,2	42
Eluição pH 3,0	9,7	32	1,7	21	1,6	31
Eluição pH 2,0	0,5	1,7	*	*	0,4	8
Total da eluição	10,2	34	1,7	21	2,0	39
Recuperação	24,8	82	6,7	86	4,2	80

(*) = níveis abaixo do limite de detecção do método (1,11 mg/dL).

Para se avaliar a influência da presença de outras proteínas na adsorção de IgG, comparou-se os resultados de adsorção de IgG de experimentos realizados a partir de soro humano sadio com os resultados de experimentos a partir de IgG humana pura. Estes ensaios cromatográficos foram realizados sob as mesmas condições e com a mesma quantidade de IgG na alimentação (30,5 mg). Calculou-se a quantidade de IgG adsorvida por volume de gel empacotado na coluna, a partir das frações de eluição. Através dos resultados obtidos (Tabela 4.10), pode-se verificar que a presença de outras proteínas influenciou na adsorção de IgG para ambos os sistemas tamponantes. Esta influência foi maior na presença de Hepes, onde a quantidade de IgG adsorvida no experimento com soro, foi 45% menor do que a quantidade adsorvida no ensaio com IgG pura. Isto ocorreu provavelmente devido à competição entre as outras imunoglobulinas e a molécula de IgG pelos sítios de ligação da proteína L.

Tabela 4.10: Quantidade de IgG adsorvida nos ensaios cromatográficos realizados com IgG humana pura e com soro humano sadio, em presença de Hepes e PBS, a pH 7,4.

Ensaio	Quantidade de IgG adsorvida (mg/mL gel)*	
	PBS	Hepes
IgG pura	2,80	5,45
Soro humano sadio	2,06	3,00

* resultados normalizados por volume de gel (coluna continha 3,40 mL de gel em todos os experimentos).

4.4 EXPERIMENTOS COM “POOLS” DE SOROS CONTENDO AUTO-ANTICORPOS

4.4.1. Remoção de auto-anticorpos

Experimentos *in vitro* empregando “pools” de amostras séricas contendo auto-anticorpos foram conduzidos visando determinar a seletividade do gel agarose-proteína L em remover diferentes auto-anticorpos (anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-Sm e anti-dsDNA). Para tanto, simulou-se uma sessão de tratamento extracorpóreo (Figura 3.2 do Capítulo 3), onde o reservatório representou o paciente. Os resultados de porcentagem de remoção de anticorpos e albumina (%R) são apresentados nas Tabelas 4.11 e 4.12, para os “pools” 1 e 2 respectivamente. Para uma melhor visualização destes resultados, fez-se uma representação gráfica (Figuras 4.15 e 4.16).

Tabela 4.11: Resultados experimentais de remoção de anticorpos e albumina em agarose-proteína L a partir do “pool” 1.

Tampão	Proteína	Inicial ⁽¹⁾	Final ⁽²⁾	QR ⁽³⁾	%R ⁽⁴⁾
PBS	anti-SS-A/Ro	330,66	85,15	72,21	74,25
	anti-SS-B/La	64,44	21,22	12,71	67,07
	anti-Sm	20,40	6,5	4,08	68,15
	anti-dsDNA	629,91	168,72	135,64	73,22
	IgG	57,00	18,48	11,33	67,58
	IgA	10,86	3,17	2,26	70,81
	IgM	4,86	1,41	1,01	71,08
	albumina	95,85	50,74	13,27	47,07
Hepes	anti-SS-A/Ro	330,66	133,55	57,97	59,61
	anti-SS-B/La	64,44	31,61	9,66	50,94
	anti-Sm	20,40	2,40	5,29	88,42
	anti-dsDNA	629,91	79,37	161,92	87,40
	IgG	57,00	16,97	11,77	70,23
	IgA	10,86	3,12	2,28	71,28
	IgM	4,86	1,25	1,06	74,19
	albumina	95,85	47,10	14,34	50,86

⁽¹⁾ Quantidade de proteína na solução sérica inicial (U ou mg);

⁽²⁾ Quantidade de proteína na solução sérica final (U ou mg);

⁽³⁾ Quantidade de proteína retida por volume de gel empacotado na coluna (U/mL ou mg/mL);

⁽⁴⁾ Porcentagem de remoção de anticorpos ou albumina.

Tabela 4.12: Resultados experimentais de remoção de anticorpos e albumina em agarose-proteína L a partir do “pool”2.

Tampão	Proteína	Inicial ⁽¹⁾	Final ⁽²⁾	QR ⁽³⁾	%R ⁽⁴⁾
PBS	anti-SS-A/Ro	194,28	62,09	38,88	68,04
	anti-SS-B/La	88,68	29,92	17,28	66,27
	anti-Sm	450,40	106,70	101,09	76,32
	anti-dsDNA	281,40	83,96	58,07	70,16
	IgG	46,50	14,22	9,49	69,41
	IgA	8,13	2,34	1,70	71,28
	IgM	4,41	1,22	0,94	72,32
	albumina	105,48	52,64	15,54	50,09
Hepes	anti-SS-A/Ro	194,28	56,90	40,41	70,71
	anti-SS-B/La	88,68	32,42	16,55	63,44
	anti-Sm	450,40	104,20	101,83	76,87
	anti-dsDNA	281,40	76,72	60,2	72,74
	IgG	46,50	12,32	10,05	73,51
	IgA	8,13	2,40	1,69	70,45
	IgM	4,41	1,10	0,97	75,11
	albumina	105,48	54,21	15,08	48,61

⁽¹⁾ Quantidade de proteína na solução sérica inicial (U ou mg);

⁽²⁾ Quantidade de proteína na solução sérica final (U ou mg);

⁽³⁾ Quantidade de proteína retida por volume de gel empacotado na coluna (U/mL ou mg/mL);

⁽⁴⁾ Porcentagem de remoção de anticorpos ou albumina.

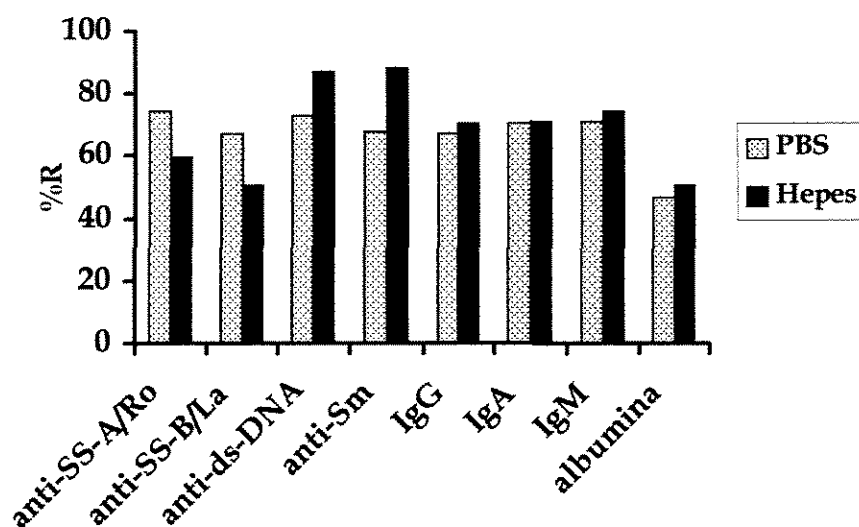


Figura 4.15: Representação gráfica dos resultados de porcentagem de remoção (%R) de auto-anticorpos e albumina presentes no "pool" 1.

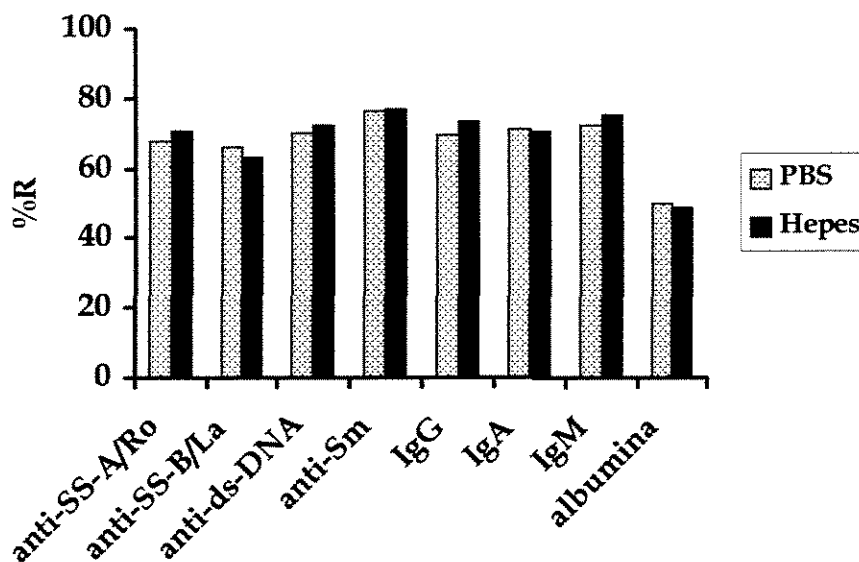


Figura 4.16: Representação gráfica dos resultados de porcentagem de remoção (%R) de auto-anticorpos e albumina presentes no "pool" 2.

Analisando-se os resultados do “pool” 1, nota-se que o sistema tamponante influenciou na %R. A presença de PBS favoreceu a remoção de anti-SS-A/Ro e anti-SS-B/La, enquanto que a presença de Hepes favoreceu a remoção de anti-Sm e anti-dsDNA. Não houve variação significativa para imunoglobulinas nem para albumina. Em contraste aos resultados do “pool” 1, o sistema tamponante não influenciou na %R para o “pool” 2. Comparando-se os valores de %R dos diferentes auto-anticorpos entre si, verifica-se que o suporte de afinidade reteve maiores quantidades de anticorpos anti-Sm e anti-dsDNA, em presença de Hepes (“pool” 1). Entretanto, para as imunoglobulinas, não se constata a possibilidade de existência de seletividade, podendo-se obter um valor médio de %R igual a $(71,4 \pm 2,1)\%$. Em relação à albumina, as porcentagens de remoção não apresentaram variações significativas em ambos os “pools”, podendo-se obter um valor médio de %R igual a $(49,2 \pm 1,7)\%$.

Na circulação extracorpórea, quanto maior a remoção de auto-anticorpos, maior a eficiência deste tratamento. Assim, pode-se concluir que os resultados deste trabalho foram promissores, indicando que o suporte de afinidade diminuiu de 51% a 88% a quantidade inicial de cada auto-anticorpo presente no “pool”. Entretanto, a quantidade de albumina removida também foi considerável (pelo menos 47%), indicando que o paciente necessitaria de reposição desta proteína.

Os resultados de perda de albumina apresentados, sugerem que grande parte desta proteína pode ter sido retida no gel de afinidade por interações não-específicas fracas ou por outros fenômenos diferentes de adsorção (retenção no espaço intersticial ou nos poros do adsorvente), uma vez que os resultados obtidos dos experimentos realizados com soro sadio mostraram a adsorção de traços de albumina em agarose-proteína L (Figura 4.14). Estas interações podem, também, estar ocorrendo com as imunoglobulinas e auto-anticorpos.

Em face destes resultados efetuou-se, após a recirculação das amostras séricas na coluna, etapas de lavagem e eluição com objetivo de obter-se a quantidade de proteína adsorvida especificamente no suporte de afinidade. Estes

dados são importantes principalmente quando o adsorvente é utilizado para purificação de anticorpos.

4.4.2. Adsorção de auto-anticorpos

Neste procedimento, após a recirculação das amostras séricas na coluna, a quantidade de proteína fracamente adsorvida na matriz de afinidade foi removida com tampão PBS ou Hepes a pH 7,4, em seguida, a fração protéica fortemente adsorvida foi eluída com tampão glicina a pH 3,0, como descrito em “Materiais e Métodos”. Os resultados de porcentagem de adsorção de anticorpos e albumina (%A) são apresentados nas Tabelas 4.13 e 4.14, para os “pools” 1 e 2 respectivamente. Para melhor visualização, estes resultados foram representados graficamente (Figuras 4.17 e 4.18).

Tabela 4.13: Resultados experimentais de adsorção de anticorpos e albumina em agarose-proteína L a partir do “pool”1.

Tampão	Proteína	Inicial ⁽¹⁾	Final ⁽²⁾	L ⁽³⁾	E ⁽⁴⁾	QA ⁽⁵⁾	%A ⁽⁶⁾
PBS	anti-SS-A/Ro	330,66	85,15	139,79	53,27	15,67	16,1
	anti-SS-B/La	64,44	21,22	28,69	6,00	1,76	9,3
	anti-Sm	20,40	6,5	7,57	6,63	1,95	32,6
	anti-dsDNA	629,91	168,72	159,64	139,48	41,02	22,1
	IgG	57,00	18,48	20,26	11,99	3,53	21,0
	IgA	10,86	3,17	2,96	1,88	0,55	17,3
	IgM	4,86	1,41	1,01	1,00	0,29	20,6
	albumina	95,85	50,74	44,06	0,09	0,03	0,1
Hepes	anti-SS-A/Ro	330,66	133,55	125,71	83,65	24,60	25,3
	anti-SS-B/La	64,44	31,61	26,41	12,10	3,56	18,8
	anti-Sm	20,40	2,40	4,27	9,05	2,66	44,4
	anti-dsDNA	629,91	79,37	120,01	233,93	68,80	37,1
	IgG	57,00	16,97	15,12	18,50	5,44	32,5
	IgA	10,86	3,12	2,80	2,44	0,72	22,5
	IgM	4,86	1,25	0,62	1,87	0,55	38,4
	albumina	95,85	47,10	39,20	0,20	0,06	0,2

⁽¹⁾ Quantidade de proteína na solução sérica inicial (U ou mg);

⁽²⁾ Quantidade de proteína na solução sérica final (U ou mg);

⁽³⁾ Quantidade de proteína nas frações de lavagem (U ou mg);

⁽⁴⁾ Quantidade de proteína nas frações de eluição (U ou mg);

⁽⁵⁾ Quantidade de proteína adsorvida por volume de gel empacotado na coluna (U/mL ou mg/mL);

⁽⁶⁾ Porcentagem de adsorção de anticorpos ou albumina.

Tabela 4.14: Resultados experimentais de adsorção de anticorpos e albumina em agarose-proteína L a partir do “pool”2.

Tampão	Proteína	Inicial ⁽¹⁾	Final ⁽²⁾	L ⁽³⁾	E ⁽⁴⁾	QA ⁽⁵⁾	%A ⁽⁶⁾
PBS	anti-SS-A/Ro	194,28	62,09	59,27	38,68	11,38	19,9
	anti-SS-B/La	88,68	29,92	15,90	21,89	6,44	24,7
	anti-Sm	450,40	106,70	146,32	166,26	48,90	36,9
	anti-dsDNA	281,40	83,96	104,80	128,89	37,91	45,8
	IgG	46,50	14,22	14,36	12,32	3,62	26,5
	IgA	8,13	2,34	2,12	1,84	0,54	22,7
	IgM	4,41	1,22	0,82	0,94	0,28	21,4
	albumina	105,48	52,64	42,77	0,12	0,04	0,1
Hepes	anti-SS-A/Ro	194,28	56,90	72,13	52,07	15,31	26,8
	anti-SS-B/La	88,68	32,42	29,65	20,35	5,99	22,9
	anti-Sm	450,40	104,20	134,16	157,42	46,30	35,0
	anti-dsDNA	281,40	76,72	99,12	125,85	37,01	44,7
	IgG	46,50	12,32	15,24	14,03	4,13	30,2
	IgA	8,13	2,40	2,71	1,65	0,49	20,3
	IgM	4,41	1,10	0,75	1,28	0,38	29,1
	albumina	105,48	54,21	47,04	0,16	0,05	0,2

⁽¹⁾ Quantidade de proteína na solução sérica inicial (U ou mg);

⁽²⁾ Quantidade de proteína na solução sérica final (U ou mg);

⁽³⁾ Quantidade de proteína nas frações de lavagem (U ou mg);

⁽⁴⁾ Quantidade de proteína nas frações de eluição (U ou mg);

⁽⁵⁾ Quantidade de proteína adsorvida por volume de gel empacotado na coluna (U/mL ou mg/mL);

⁽⁶⁾ Porcentagem de adsorção de anticorpos ou albumina.

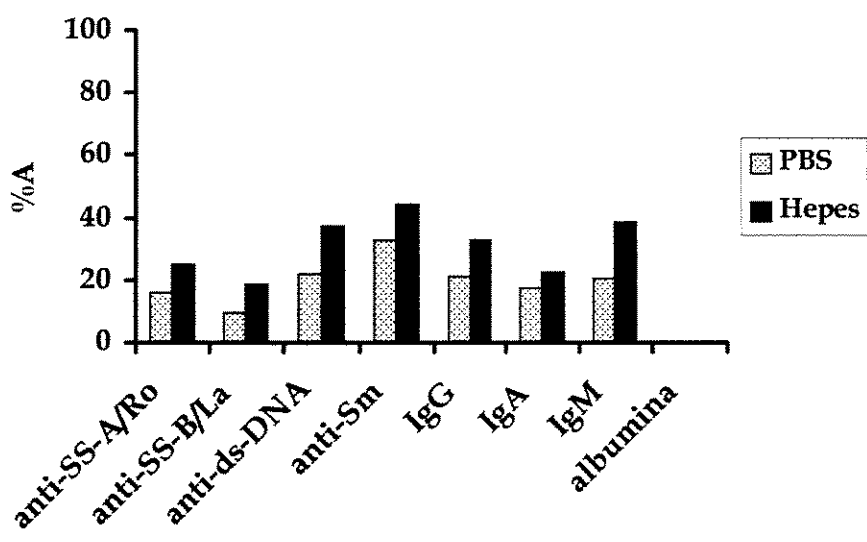


Figura 4.17: Representação gráfica dos resultados de porcentagem de adsorção (%A) de auto-anticorpos e albumina presentes no “pool” 1.

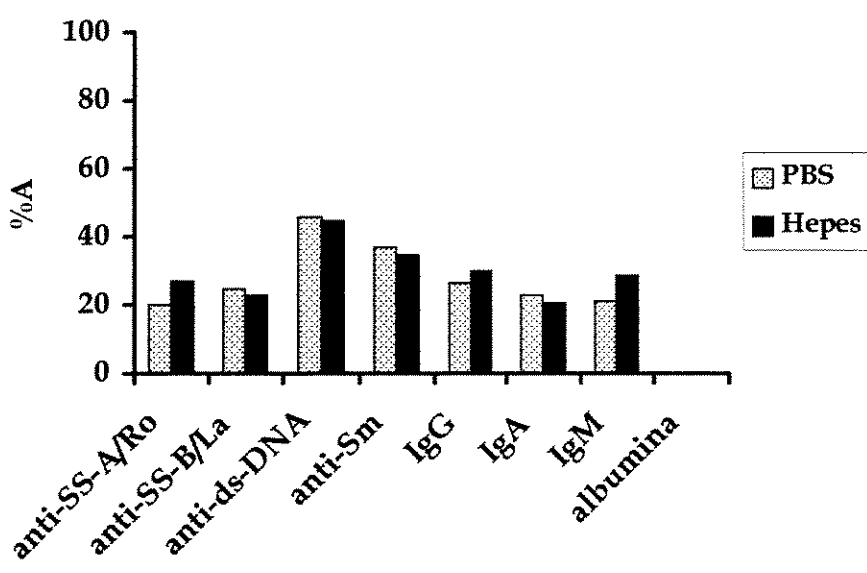


Figura 4.18: Representação gráfica dos resultados de porcentagem de adsorção (%A) de auto-anticorpos e albumina presentes no “pool” 2.

Analisando-se os resultados do “pool” 1, constata-se que o sistema tamponante influenciou na %A. A presença do tampão Hepes favoreceu a adsorção de todos os auto-anticorpos e de todas as imunoglobulinas deste “pool”. Mais uma vez os resultados do “pool” 2 não mostraram variações significativas em relação ao sistema tamponante, exceto para anti-SS-A/Ro (6,9%) e IgM (7,7%).

Comparando-se os valores de %A dos diferentes auto-anticorpos entre si, pode-se concluir que o suporte de afinidade adsorveu maiores quantidades de anticorpos anti-dsDNA e anti-Sm, em ambos os “pools”, como verificado apenas pelas quantidades removidas (%R). Os valores de %A iguais a 0,1 e 0,2% para albumina, indicam a fraca interação desta proteína com o suporte de afinidade.

Comparando-se os valores de %A e %R, nota-se que para todos os auto-anticorpos, imunoglobulinas e albumina, os valores de %R são superiores aos de %A. Estes resultados confirmam que grande parte das proteínas estudadas não foi realmente adsorvida no gel de afinidade. Provavelmente estas proteínas permaneceram no interior dos poros das partículas do adsorvente e no espaço intersticial durante a recirculação da amostra sérica, ou foram adsorvidas por interações muito fracas não-específicas.

Diante dos resultados de %A, conclui-se que o suporte agarose-proteína L apresenta condições mais favoráveis (maior seletividade) para a purificação de anti-dsDNA e anti-Sm, ambos em presença de Hepes. Além disso, possui a vantagem de não adsorver albumina, que seria uma impureza.

4.4.3. Experimentos em frascos agitados

Os experimentos em frascos agitados tiveram por finalidade a comparação do desempenho do suporte de afinidade agarose-proteína L com dados da literatura de outros adsorventes utilizados em uso clínico para remoção de auto-anticorpos. Os ensaios foram conduzidos na ausência de tampão, condição mais próxima da utilizada clinicamente. Os suportes estudados por IKONOMOV *et al.*

(1992) foram Sepharose-proteína A, PVA-triptofano, PVA-fenilalanina e sulfato de dextrana, todos disponíveis comercialmente. A comparação feita em relação às porcentagens de remoção de anti-dsDNA, IgG, IgA e IgM é apresentada na Tabela 4.15.

Tabela 4.15: Comparação das porcentagens de remoção de anticorpos (%R) dos suportes de afinidade agarose-proteína L, Sepharose-proteína A, PVA-triptofano, PVA-fenilalanina e sulfato de dextrana, obtidas nos experimentos em frascos agitados.

Anticorpo	agarose-Proteína L		Sepharose-proteína A*	PVA-triptofano*	PVA-fenilalanina*	sulfato de dextrana*
	"pool" 1	"pool" 2				
anti-dsDNA	24	35	83	65	75	32
IgG	35	37	86	50	45	22
IgA	38	36	25	21	29	15
IgM	34	38	50	52	56	30

* Resultados obtidos por IKONOMOV *et al.* (1992).

Comparando-se os valores de %R de anti-ds-DNA, verifica-se que a retenção deste anticorpo em agarose-proteína L ("pool" 2) foi similar à obtida em sulfato de dextrana e inferior às obtidas nos outros suportes. A retenção de IgG e IgM em agarose-proteína L foi mais efetiva do que em sulfato de dextrana e menos efetiva do que nos outros suportes. Por outro lado, os valores de %R de IgA em agarose-proteína L superaram em 13%, 17%, 9% e 23% os valores de %R de IgA em Sepharose-proteína A, PVA-triptofano, PVA-fenilalanina e sulfato de dextrana, respectivamente. Entretanto, esta comparação é feita com ressalvas, uma vez que

se desconhece a caracterização das amostras séricas utilizadas por IKONOMOV *et al.* (1992).

Com a finalidade de se verificar a provável influência da presença do tampão na retenção de proteínas em agarose-proteína L, comparou-se os valores de %R obtidos nos experimentos em frascos agitados com os obtidos nos ensaios com recirculação (Tabela 4.16). Esta comparação foi possível, uma vez que a razão volume de adsorvente por volume de solução sérica foi igual a 1:2 em ambos os experimentos.

Tabela 4.16: Comparação das porcentagens de remoção de anticorpos e albumina (%R) em agarose-proteína L, obtidas nos experimentos em frascos agitados (ausência de tampão) e nos ensaios com recirculação (presença de tampão PBS).

Proteína	Ensaio em frascos agitados (sem tampão)		Ensaio com recirculação (com tampão)	
	"Pool" 1	"Pool" 2	"Pool" 1	"Pool" 2
anti-SS-A/Ro	51	65	74	68
anti-SS-B/La	42	49	67	66
anti-Sm	24	38	68	76
anti-dsDNA	24	35	73	70
IgG	35	37	68	69
IgA	38	36	71	71
IgM	34	38	71	72
albumina	28	32	47	50

Os resultados mostraram a influência do tampão na %R para os auto-anticorpos estudados e para albumina, causando aumentos mais significativos nos

valores de porcentagem de remoção para anti-Sm e anti-dsDNA. Apesar dos diferentes valores de temperatura destes ensaios (37°C e 25°C), a adsorção de IgG varia muito pouco com a temperatura, na faixa de 4°C a 37°C (KIHLBERG *et al.*, 1996).

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS

5.1 CONCLUSÕES

A principal conclusão resultante deste trabalho foi que a aplicação do gel agarose-proteína L na remoção de imunoglobulinas (G, A e M) e de auto-anticorpos, a partir de amostras séricas, é potencialmente viável. No entanto, a quantidade de albumina removida indica que o paciente necessitaria de reposição desta proteína.

Outras conclusões relevantes obtidas foram:

a) Dentre os tampões estudados, obteve-se maior adsorção de IgG em agarose-proteína L, em presença de tampão Hepes a pH 7,0, condição na qual ele se encontra na forma zwitteriônica. Além disso, constatou-se diminuição de adsorção de IgG com aumento de pH para todos os tampões, exceto Tris-HCl.

b) O ajuste dos parâmetros do modelo de Langmuir, forneceu valores de Q_m dentro da faixa fornecida pelo fabricante do adsorvente e valores de K_d na faixa micromolar (10^{-7}), indicando alta afinidade, que é típica para ligantes de afinidade bioespecíficos.

c) O ajuste dos parâmetros do modelo de Langmuir-Freundlich forneceu valores de capacidade máxima de adsorção e constante de dissociação do complexo IgG-proteína L, similares aos obtidos pelo modelo de Langmuir, exceto $K_{d(LF)}$ na presença de tampão Hepes. Os valores do expoente de Langmuir-Freundlich (n) iguais a 0,77 e 1,6 para os experimentos realizados com PBS e Hepes, indicaram a existência de cooperatividade negativa e positiva,

respectivamente. Estes resultados foram coerentes com os obtidos pelos gráficos de Scatchard.

d) Resultados qualitativos dos ensaios com soro humano sadio obtidos através de eletroforese SDS-PAGE, indicaram que grandes quantidades de IgG e pequenas quantidades de albumina e outras proteínas do soro foram retidas na matriz, para ambos os tampões utilizados. Estes resultados foram parcialmente confirmados na quantificação de IgG, IgA e IgM por nefelometria. Neste método, verificou-se que quantidades consideráveis dessas imunoglobulinas foram adsorvidas na matriz (pelo menos 21% do total injetado).

e) Os resultados de remoção de auto-anticorpos mostraram que o suporte de afinidade diminui de 51% a 88% a quantidade inicial de cada auto-anticorpo presente no “pool”.

f) Para todos os auto-anticorpos, imunoglobulinas e albumina, os valores de %A foram inferiores aos de %R. Estes resultados confirmam que grande parte das proteínas estudadas não foi realmente adsorvida no gel de afinidade. Os resultados de %A também mostraram que o suporte apresenta maior capacidade de adsorção de anti-dsDNA e anti-Sm.

g) Na comparação do desempenho do suporte em estudo com dados da literatura de outros adsorventes utilizados em uso clínico para remoção de auto-anticorpos (IKONOMOV *et al.*, 1992), observou-se que os valores de %R de anti-dsDNA para agarose-proteína L foram inferiores aos valores dos outros suportes comparados (exceto sulfato de dextrana). Porém, esta comparação é feita com ressalvas, uma vez que se desconhece a caracterização das amostras séricas utilizadas por IKONOMOV *et al.* (1992).

h) A comparação dos valores de %R obtidos nos experimentos em frascos agitados com os obtidos nos ensaios com recirculação, mostrou que em presença de tampão, a retenção das proteínas aumentou.

5.2 SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS

Diante dos resultados promissores de remoção de auto-anticorpos em agarose-proteína L obtidos neste trabalho, acredita-se que este tema de pesquisa poderia vir a ser mais explorado no futuro.

Algumas são as sugestões àqueles que derem continuidade a este trabalho:

- Testar a remoção de outros auto-anticorpos;
- Verificar a ocorrência de desprendimento de proteína L da matriz durante a passagem de plasma pela coluna;
- Realizar testes de hemocompatibilidade;
- Investigar, através de análise de custo, a viabilidade desse suporte na aplicação no tratamento extracorpóreo de pacientes com doenças auto-imunes, comparando-se com os suportes já disponíveis para tratamento *in vivo*.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKERSTRÖM, B.; BRODIN, T.; REIS, K.; BJÖRCK, L. Protein G: A powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. **The Journal of Immunology**, v.135, n.4, p.2589-2592, 1985.
- AKERSTRÖM, B.; NILSON, B.H.K.; HOOGENBOOM, H.R.; BJÖRCK, L. On the interaction between single chain Fv antibodies and bacterial immunoglobulin-binding proteins. **Journal of Immunological Methods**, v.177, p.151-163, 1994.
- ANDRADE, J.D. **Surface and interfacial aspects of biomedical polymers**. New York, Plenum, vol.2, 1985.
- ARBISER, J.L.; DZIECZKOWSKI, J.S.; HARMON, J.V.; DUNCAN L.M. Leukocytoclastic vasculitis following staphylococcal protein A column immunoadsorption therapy. **Archives Dermatology**, v.131, p.707-709, 1995.
- BALINT, J.P.; SNYDER, H.W.; COCHRAN, S.K.; JONES, F.R. Long term response of immune thrombocytopenia to extracorporeal immunoadsorption. **Lancet**, v.337, n.8749, p.1106-1106, 1991.
- BALINT, J.P.; QUAGLIATA, F.; COCHRAN, S.K.; JONES, F.R. Association of antiplatelet IgG antibody-levels with response to extracorporeal protein A/silica immunoadsorption in ITP patients. **American Journal of Hematology**, v.50, n.1, p.74-75, 1995.
- BAROCCI, S. & NOCERA, A. *In vitro* removal of anti-HLA IgG antibodies from highly sensitized transplant recipients by immunoadsorption with protein A and protein G Sepharose columns: a comparison. **Transplant International**, v.6, p.26-33, 1993.
- BECKINGHAM, J.A.; BOTTOMLEY, S.P.; HINTON, R.; SUTTON, B.J.; GORE, M.G. Interactions between a single immunoglobulin-binding domain of protein L from *Peptostreptococcus magnus* and a human κ light chain. **Biochemical Journal**, v.340, parte 1, p.193-199, 1999.

- BERTA, E.; CONFALONIERI, P.; SIMONCINI, O.; BERNARDI, G.; MANTEGAZZA, R.; CORNELIO, F. E.; ANTOZZI, C. Removal of antiacetylcholine receptor antibodies by protein-A immunoadsorption in Myasthenia gravis. **The International Journal of Artificial Organs**, v.17, n.11, p.603-608, 1994.
- BERRUEX, L.G.; FREITAG, R.; TENNIKOVA, T.B. Comparison of antibody binding to immobilized group specific affinity ligands in high performance monolith affinity chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.24, p.95-104, 2000.
- BJÖRCK, L. & KRONVALL, G. Purification and some properties of *streptococcal* protein G, a novel IgG-binding reagent. **The Journal of Immunology**, v.133, p.969-974, 1984.
- BJÖRCK, L. Protein L: a novel bacterial cell wall protein with affinity for Ig L chains. **The Journal of Immunology**, v.140, n.4, p.1194-1197, 1988.
- BOYLE, M.D.P. & REIS, K.J. Bacterial Fc Receptors. **Bio/Technology**, v.5, n.7, p.697-703, 1987.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BUENO, S.M.A.; HAUPT, K.; VIJAYALAKSHMI, M.A. *In vitro* removal of human IgG by pseudobiospecific affinity membrane filtration on a large scale. A preliminary report. **The International Journal of Artificial Organs**, v.18, n.7, p.392-398, 1995a.
- BUENO, S.M.A.; HAUPT, K.; VIJAYALAKSHMI, M.A. Separation of immunoglobulin G from human serum by pseudobioaffinity chromatography using immobilized L-histidine in hollow fibre membranes. **Journal of Chromatography B**, v.667, p.57-67, 1995b.
- BUENO, S.M.A.; LEGALLAIS, C.; HAUPT, K.; VIJAYALAKSHMI, M.A. Experimental kinetic aspects of hollow fiber membrane-based pseudobioaffinity filtration: process for IgG separation from human plasma. **Journal of Membrane Science**, v.117, p.45-56, 1996.

- BURNOUF, T.; GOUBRAN, H.; RADOSEVICH, M. Application of bioaffinity technology in therapeutic extracorporeal plasmapheresis and large-scale fractionation of human plasma. **Journal of Chromatography B**, v.715, p.65-80, 1998.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins - patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 6ª ed., 2000, p.191-202.
- DARNIGE, L.; LEGALLAIS, C.; ARVIEUX, J.; VILCOT, J.R.; VIJAYALAKSHMI, M.A. Functionalized hollow fiber membrane cartridge for adsorption of anticoagulant/antiphospholipid antibodies: A potential tool for treatment. **Artificial Organs**, v.23, n.9, p.834-839, 1999.
- DEVLIN, T.M. **Textbook of biochemistry with clinical correlations**. Philadelphia, John Wiley & Sons, 4ª ed., 1997, p.71-79.
- FERREIRA, A.W. & ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996, 302p.
- FUDENBERG, H.H.; STITES, D.P.; CALDWELL, J.L.; WELL, I.V. **Imunologia básica e clínica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2ª ed., 1980, p.307-315; 420-426.
- GADDIS, T.G.; GUTHRIE, T.H.; DREW, M.J.; SAHUD, M.; HOWE, R.B.; MITTELMAN, A. Treatment of plasma refractory thrombotic thrombocytopenic purpura with protein A immunoadsorption. **American Journal of Hematology**, v.55, n.2, p.55-58, 1997.
- GUTHRIE, T.H. & ORAL, A. Immune thrombocytopenia purpura - a pilot study of staphylococcal protein-A immunomodulation in refractory patients. **Seminars in Hematology**, v.26, n.2, suppl. 1, p.3-9, 1989.
- IKONOMOV, V.; SAMTLEBEN, W.; SCHMIDT, B.; BLUMENSTEIN, M.; GURLAND, H.J. Adsorption profile of commercially available adsorbents: an *in vitro* evaluation. **The International Journal of Artificial Organs**, v.15, n.5, p.312-319, 1992.

- JAMES, E.A. & DO, D.D. Equilibria of biomolecules on ion-exchange adsorbents. **Journal of Chromatography**, v.542, n.1, p.19-28, 1991.
- KASTERN, W.; SJÖBRING, U.; BJÖRCK, L. Structure of Peptostreptococcal protein L and identification of a repeated immunoglobulin light chain-binding domain. **The Journal of Biological Chemistry**, vol.267, n.18, p.12820-12825, 1992.
- KIHLBERG, B.M.; SJOHOLM, A.G.; BJÖRCK, L.; SJOBRING, U. Characterization of the binding properties of protein LG, an immunoglobulin-binding hybrid protein. **European Journal of Biochemistry**, vol.240, n.3, p.556-563, 1996.
- KOUKI, T.; INUI, T.; OKABE, H.; OCHI, Y.; KAJITA, Y. Separation method of IgG fragments using protein L. **Immunological Investigations**, v.26, p.399-408, 1997.
- LAHITA, R.G. **Systemic Lupus Erythematosus**. Churchill Livingstone Inc, 2^a ed., 1992.
- VON LANDENBERG, C.; LACKNER, K.J.; VON LANDENBERG, P.; LANG, B.; SCHMITZ, G. Isolation and characterization of two human monoclonal anti-phospholipid IgG from patients with autoimmune disease. **Journal of Autoimmunity**, v.13, p.215-223, 1999.
- LANGONE, J.J. Use of protein A in quantitative immunochemical analysis of antigens and antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v.51, p.3-22, 1982.
- LUO, Q.L. & ANDRADE, J.D. Cooperative adsorption of proteins onto hydroxyapatite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.200, n.1, p.104-113, 1998.
- MALCHESKY, P.S.; KAPLAN, A.; KOO, A.P.; SAKURADA, Y.; SIAMI, G.A. Are selective macromolecule removal plasmapheresis systems useful for autoimmune diseases or hyperlipidemia? **ASAIO Journal**, p.868-872, 1993.
- MANDARO, R.M.; ROY, S.; KENNETH, C.H. Filtration supports for affinity separations. **Biotechnology**, v.5, p.928-932, 1987.
- MARAN, R.; DUEYMES, M.; LE CORRE, R.; RENAUDINEAU, Y.; SHOENFELD, Y.; YOUINOU, P. IgG subclasses of human autoantibodies. **Annals Medicine Interne**, v.148, n.1, p.29-38, 1997.

- MUROI, K.; SASAKI, R.; MIURA, Y. The effect of immunoadsorption therapy by a protein A column on patients with thrombocytopenia. **Seminars in Hematology**, v.26, n.2, suppl. 1, p.10-14, 1989.
- MURPHY, J.P.; ATKINSON, M.; TROWERN, A.R.; STEVENS, G.B.; ATKINSON, T.; DUGGLEBY, C.J.; HINTON, R.J. Amplified expression and large-scale purification of protein L. **Bioseparation**, v.6, p.107-113, 1996.
- MYHRE, E.B. & ESNTELL, M. A non-immune interaction between the light chain of human-immunoglobulin and a surface component of a *Peptococcus magnus* strain, **Molecular Immunology**, v.22, p.879-885, 1985.
- NILSON, B.H.K.; SOLOMON, A.; BJÖRCK, L.; AKERSTRÖM, B. Protein L from *Peptostreptococcus magnus* binds to the κ light chain variable domain. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.4, p.2234-2239, 1992.
- NILSON, B.H.K.; LOGDBERG, L.; KASTERN, W.; BJÖRCK, L.; AKERSTRÖM, B. Purification of antibodies using protein L-binding framework structures in the light chain variable domain. **Journal of Immunological Methods**, v.164, p.33-40, 1993.
- PALMER, A.; CAIRNS, T.; DISCHE, F.; GLUCK, G.; GJØRRSTRUP, P.; PARSONS, V.; WELSH, K.; TAUBE, D. Treatment of rapidly progressive glomerulonephritis by extracorporeal immunoadsorption, prednisolone and cyclophosphamide. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.6, p.536-542, 1991.
- QUINÔNES, I. & GUIOCHON, G. Extension of a Jovanovic-Freundlich isotherm model to multicomponent adsorption on heterogeneous surfaces. **Journal of Chromatography A**, v.796, n.1, p.15-40, 1998.
- REVILLARD, J.P. **Immunologie**. Bruxelles, De Boeck-Wesmael S.A., 1994.
- RICHTER, W.O.; DONNER, M.G.; SELAMIER, A.; HILLER, E.; SCHAWANDT, P. Efficacy and safety of immunoglobulin apheresis. **ASAIO Journal**, v.43, p.53-59, 1997.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. São Paulo, Manole Ltda, 1999.

SCHNEIDER, K.M.; BERNING, T.; WALDENDORF, M.; GLASER, J.; GERLACH, U. Immunoabsorbent plasma perfusion in patients with systemic lupus erythematosus. **The Journal of Rheumatology**, v.17, n.7, p.900-907, 1990.

SCHNEIDER, K.M. Plasmapheresis and immunoabsorption: different techniques and their current role in medical therapy. **Kidney International**, v.53, n.64, p.S61-S65, 1998.

SHARMA, S. & AGARWAL, G.P. Interactions of proteins with immobilized metal ions: a comparative analysis using various isotherm models. **Analytical Biochemistry**, v.288, p.126-140, 2001.

SNYDER, H.W.; COCHRAN, S.K.; BALINT, J.P.; BERTRAM, J.H.; MITTELMAN, A.; GUTHRIE, T.H.; JONES, F.R. Experience with protein A-immunoabsorption in treatment-resistant adult immune thrombocytopenic purpura. **Blood**, v.79, p.2237-2245, 1992.

STRYER, Lubert. **Biochemistry**. New York, Freeman, 1995, 1064p.

VENTURA, R.C.A. **Remoção de auto-anticorpos de amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes empregando filtração em membranas de afinidade**. Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. 99p. Tese (Mestrado).

VENTURA, R.C.A.; ZOLLNER, R.L.; LEGALLAIS, C.; VIJAYALAKSHMI, M.A.; BUENO, S.M.A. A pseudobiospecific hollow fiber cartridge for *in vitro* adsorption of autoantibodies from pathological serum. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.17, p.881-886, 2000.

VENTURA, R.C.A.; ZOLLNER, R.L.; LEGALLAIS, C.; VIJAYALAKSHMI, M.A.; BUENO, S.M.A. *In vitro* removal of human IgG autoantibodies by affinity filtration using immobilized L-histidine onto PEVA hollow fiber membranes, **Genetic Analysis: Biomolecular Engineering**, v. 17, p.71-74, 2001.

VLUG, A. & VAN REMORTEL, P. The structure and function of human IgG subclasses. **American Clinical Laboratory**, v. 8, p.28-36, 1989.

WIESENHUTTER, C.W.; IRISH, B.L.; BERTRAM, J.H. Treatment of patients with refractory rheumatoid arthritis with extracorporeal protein A immunoadsorption columns: a pilot trial. **Journal of Rheumatology**, v.21, n.5, p.804-812, 1994.

YAMAZAKI, Z.; IDEZUKI, Y.; INOUE, N.; YOSHIZAWA, H.; YAMAZAKI, N.; INAGAKI, K.; TSUDA, N. Extracorporeal immunoadsorption with IM-PH or IM-TR column. **Biomaterial, Artificial Cells, Artificial Organs**, v.17, n.2, p.117-124, 1989.