UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

REMOÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS DE AMOSTRAS SÉRICAS DE PACIENTES COM DOENÇAS AUTO-IMUNES EMPREGANDO FILTRAÇÃO EM MEMBRANAS DE AFINIDADE

Engª Roberta Cristina Arena Ventura
Aluna de Mestrado

Profª Drª 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

julho de 1999

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
V. Ex.
TOMBO BC/ 39330
PROC. 329/99
C D X
PREÇO R$ 11,00
DATA 29/10/99
N.º CPD

CM-00136624-4

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

V567r

Ventura, Roberta Cristina Arena
Remoção de auto-anticorpos de amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes empregando filtração em membranas de afinidade. / Roberta Cristina Arena Ventura. --Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientadores: Sônia Maria Alves Bueno, Ricardo de Lima Zollner.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Membranas (Tecnologia). 2. Imunoglobulina G. 3. Proteínas - Separação. 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 DE AMOSTRAS SÉRICAS DE PACIENTES COM DOENÇAS AUTO-IMUNES EMPREGANDO FILTRAÇÃO EM MEMBRANAS DE AFINIDADE

Autora: Engª Roberta Cristina Arena Ventura
Orientadora: Profª Drª Sônia Maria Alves Bueno
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Profª Drª Sônia Maria Alves Bueno
Universidade Estadual de Campinas - FEQ

Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine
Universidade Estadual de Campinas - IQ

Profª Drª Maria Helena Andrade Santana
Universidade Estadual de Campinas - FEQ

Campinas, 06 de julho de 1999.

Aos meus pais, José Carlos e Mariluci

por terem me dado a vida e me incentivado todos esses anos.

Ao Duda

pelo apoio e presença constante em mais essa etapa.

AGRADECIMENTOS

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

À minha família.

Aos orientadores: Profª Drª Sônia Maria Alves Bueno e Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner.

Aos amigos dos laboratórios da FEQ: Adriano, Eduardo, Fábio, José Antônio, Denise, Ana, Giuliana, Líbia, Luciana, Marisa, Carla, Mirela, Marcelo, Marcelo Viegas, Oselys, Paula, Rosana, Sérgio, Victor, Vinícius, Rodrigo, Marisa, João Gabriel, Priscila e César. Ao Elcimar pela doação de sangue e à Sandra pelo companheirismo.

Aos amigos do laboratório de Imunologia Clínica: Danielle, Maira Eduarda, Conceição, Margarida, Luís, Sandra e Ivone pela ajuda nas etapas mais difíceis desse trabalho e pelos momentos bons proporcionados.

Ao Prof. Dr. César Costapinto Santana pela oportunidade de realização dos experimentos em seus laboratórios.

À Profª Drª Maria Helena Andrade Santana e à Profª Drª Ângela Maria Moraes pelas valiosas sugestões do exame de qualificação.

Aos apoios financeiros da FAPESP, FAEP e PADCT.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....i

LISTA DE FIGURAS.....iii

RESUMO.....v

ABSTRACT.....vi

CAPÍTULO1:
INTRODUÇÃO.....1

1.1. A IMPORTÂNCIA DA TERAPÊUTICA DAS DOENÇAS AUTO-IMUNES.....1

1.2. OBJETIVO E ETAPAS PROPOSTAS.....2

CAPÍTULO 2:
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....4

2.1. DOENÇAS AUTO-IMUNES.....4

2.2. IMUNOGLOBULINAS.....6

2.2.1. Imunoglobulinas: estrutura e função.....6

2.2.2. Auto-anticorpos.....9

2.3. TRATAMENTO DAS DOENÇAS AUTO-IMUNES.....12

CAPÍTULO 3:
MATERIAIS E MÉTODOS.....22

3.1. MATERIAIS.....22

3.2. MÉTODOS.....23

3.2.1. Quantificação de proteínas.....23

3.2.2. Teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....23

3.2.3. Dosagem de IgG, IgA, IgM e albumina por nefelometria.....24

3.2.4. Ativação das membranas de PVA e PEVA finamente cortadas.....25

3.2.5. Imobilização de histidina em membranas de PVA e PEVA.....25

3.2.6. Cromatografia em coluna com membranas His-PVA e His-PEVA finamente cortadas.....25

3.2.7. Eletroforese Phast-System Pharmacia SDS-PAGE.....26

3.2.8. Experimentos com amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes em membranas de fibras ocas de PEVA finamente cortadas.....27
3.2.9. Experimentos utilizando o módulo de membranas de fibras ocas de PEVA.....28
3.2.10. Experimentos de filtração com "pools" de soros de pacientes com doenças auto-imunes.....39

CAPÍTULO 4:
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....46

4.1. ADSORÇÃO DE IgG EM FIBRAS OCAS DE PVA COM HISTIDINA IMOBILIZADA.....46
4.1.1. Ativação da membrana de PVA e imobilização de histidina.....46
4.1.2. Experimentos cromatográficos com membranas His-PVA.....47
4.2. ADSORÇÃO DE ANTICORPOS EM MEMBRANAS DE FIBRAS OCAS DE PEVA COM HISTIDINA IMOBILIZADA.....51
4.2.1. Adsorção de IgG humana pura em His-PEVA.....51
4.2.2. Adsorção de auto-anticorpos em His-PEVA.....53
4.3. REMOÇÃO *IN VITRO* DE AUTO-ANTICORPOS EM MÓDULO DE FILTRAÇÃO HIS-PEVA.....56
4.3.1. Verificação da imobilização de histidina nas membranas por sulfato de cobre....56
4.3.2. Retenção de IgG humana pura em His-PEVA.....56
4.3.3. Influência de Q_F/Q_I na filtração do plasma em His-PEVA.....62
4.3.4.Retenção e Adsorção de auto-anticorpos em His-PEVA.....63

CAPÍTULO 5:
CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....77

5.1. CONCLUSÕES.....77
5.2. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....79

CAPÍTULO 6:
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....81

ANEXO.....90

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Algumas propriedades físico-químicas das imunoglobulinas.....8

Tabela 2.2 - Propriedades das subclasses de IgG.....9

Tabela 2.3 - Propriedades do aminoácido histidina.....18

Tabela 3.1 - Condições determinadas para a realização do planejamento experimental.....36

Tabela 3.2 - Planejamento experimental linear 2^2 para estudar os efeitos da concentração de IgG na alimentação e da relação Q_F/Q_I na retenção de IgG em His-PEVA.....36

Tabela 3.3 - Condições determinadas para a realização do segundo planejamento experimental.....37

Tabela 3.4 - Planejamento experimental linear 2^2 para estudar os efeitos da concentração de IgG na alimentação e da relação Q_F/Q_I na retenção de IgG em His-PEVA.....37

Tabela 3.5 - "Pool" 1 de auto-anticorpos anti-dsDNA.....40

Tabela 3.6 - "Pool" 2 de auto-anticorpos anti-dsDNA.....40

Tabela 3.7 - "Pool" de auto-anticorpos anti-SS-A/Ro.....41

Tabela 3.8 - "Pool" 4 de vários auto-anticorpos.....41

Tabela 3.9 - "Pool" 5 de vários auto-anticorpos.....42

Tabela 4.1 - Balanço de massa referente aos experimentos com IgG pura em His-PVA utilizando-se o tampão de equilíbrio Hepes a 25 mM a pH 7,0 e Mops a 25 mM a pH 6,5.....49

Tabela 4.2 - Balanço de massa referente as cromatografias de IgG pura em membranas His-PEVA utilizando-se os tampões de equilíbrio Hepes a 25 mM a pH 7,0 e Mops a 25 mM a pH 6,5.....52

Tabela 4.3 – Comparação das quantidades de IgG adsorvida por volume de leito utilizado para His-PVA e His-PEVA.....52

Tabela 4.4 - Amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes selecionadas para o estudo.....54

Tabela 4.5 - Quantidades de auto-anticorpos presentes nas frações de eluição e comparação com o valor mínimo positivo estabelecido pelo teste.....55

Tabela 4.6 - Resultados do planejamento experimental linear 2^2 realizado com IgG humana pura para avaliar a retenção de IgG em His-PEVA através de variações na concentração de IgG na alimentação e na razão Q_F/Q_I.....57

Tabela 4.7 – Análise de regressão e variância do planejamento experimental linear 2^2 realizado para verificar a influência das variáveis concentração de IgG na alimentação e razão Q_F/Q_I na capacidade de retenção de IgG em His-PEVA.....58

Tabela 4.8 - Avaliação dos resultados obtidos do planejamento experimental linear 2^2 efetuado para estudar os efeitos da concentração de IgG na alimentação e da razão Q_F/Q_I na retenção de IgG em His-PEVA.....60

Tabela 4.9 - Análise de regressão e variância do planejamento experimental linear 2^2 realizado para verificar a influência das variáveis concentração de IgG na alimentação e razão Q_F/Q_I na capacidade de retenção de IgG em His-PEVA.....61

Tabela 4.10 - Análise da influência de Q_F/Q_I na retenção de IgG de plasma humano sadio em His-PEVA.....63

Tabela 4.11 - Quantidades dos auto-anticorpos presente nos "pools" de amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes obtidas através de teste ELISA.....64

Tabela 4.12 – Resultados experimentais de retenção e adsorção dos auto-anticorpos anti-dsDNA, anti-SS-A/Ro, anti-Sm e anti-Sm/RNP no módulo de membranas de fibras ocas His-PEVA.....68

Tabela 4.13 - Resultados experimentais referentes as análises nefelométricas realizadas para verificar a adsorção e retenção em His-PEVA de IgG, IgM, IgA e albumina.....74

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - Espectro das doenças auto-imunes.....5

FIGURA 2.2 - Estrutura do anticorpo (imunoglobulina G).....7

FIGURA 2.3 - Esquema das diferentes subclasses de IgG.....9

FIGURA 2.4 - Princípio do tratamento extracorpóreo por adsorção seletiva de auto-anticorpo.....14

FIGURA 2.5 – Fórmula estrutural do aminoácido histidina.....18

FIGURA 2.6 - Esquema da filtração por afinidade em membranas de fibras ocas.....20

FIGURA 3.1 - Esquema dos experimentos cromatográficos realizados com amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes.....28

FIGURA 3.2 - Esquema do módulo de membranas de fibras ocas de PEVA.....29

FIGURA 3.3 - Esquema dos modos de lavagem das membranas de fibras ocas His-PEVA.....31

FIGURA 3.4 - Esquema da montagem experimental para a ativação das membranas de fibras ocas com 1,4 butanodiol diglicidil éter.....31

FIGURA 3.5 - Esquema utilizado para a imobilização de L-histidina em membranas de fibras ocas de PEVA.....32

FIGURA 3.6 - Esquema de montagem experimental dos experimentos de filtração com imunoglobulina G.....34

FIGURA 3.7 - Esquema de montagem experimental dos experimentos com plasma humano sadio.....39

FIGURA 4.1 - Estrutura proposta da membrana de fibra oca de álcool poli vinílico com histidina imobilizada, após ativação com 1,4 butanodiol diglicidil éter 47

FIGURA 4.2 - Cromatograma com IgG pura em membranas de fibras ocas de His-PVA em tampão Hepes a 25 mM a pH 7,0. Injeção de 2 mg de IgG diluída em 2 ml de tampão de equilíbrio (A). Eluição: tampão acetato de sódio a 25 mM contendo 1 M de NaCl a pH 4,0 (B). Regeneração: solução de NaOH a 25 mM (C). Volume de leito de 1 ml. Vazão de alimentação de 0,4 ml/min. Volume das frações de 2,4 ml.....48

FIGURA 4.3 - Cromatograma com IgG pura em membranas de fibras ocas His-PVA em tampão Mops a 25 mM a pH 6,5. Injeção de 2 mg de IgG diluída em 2 ml de tampão de equilíbrio (A). Eluição: tampão acetato de sódio a 25 mM contendo 1 M de NaCl a pH 4,0 (B). Regeneração: solução de NaOH a 25 mM (C). Volume de leito de 1 ml. Vazão de

alimentação de 0,4 ml/min. Volume das frações de 2,4 ml.....48

FIGURA 4.4 - Eletroforese SDS-PAGE em condições não-redutoras com gel de acrilamida, gradiente 4-15%, referente as frações obtidas na cromatografia com plasma humano sadio em His-PVA utilizando-se o tampão de equilíbrio Hepes a 25 mM a pH 7,0. Faixas: 1 - plasma total; 2 – frações de lavagem (pico 1); 3 – frações de eluição (pico 2); 4 - IgG pura (Sigma).....50

FIGURA 4.5 - Esquema do cromatograma típico dos experimentos com amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes em membranas His-PEVA utilizando-se como tampão de equilíbrio Hepes a 25 mM a pH 7,0.....54

FIGURA 4.6 - Superfície de resposta do planejamento experimental linear 2^2 realizado para estudar os efeitos das variáveis concentração de IgG na alimentação e razão Q_F/Q_I na capacidade de retenção de IgG em His-PEVA.....59

FIGURA 4.7 - Superfície de resposta do planejamento experimental linear 2^2 realizado para estudar os efeitos das variáveis concentração de IgG na alimentação e razão Q_F/Q_I na capacidade de retenção de IgG em His-PEVA.....61

FIGURA 4.8 – Fórmulas estruturais dos tampões utilizados para a adsorção de auto-anticorpos em His-PEVA.....65

FIGURA 4.9 - Representação gráfica dos resultados de capacidade de retenção dos auto-anticorpos presentes no "pool" 4 em His-PEVA.....69

FIGURA 4.10 - Representação gráfica dos resultados de capacidade de adsorção dos auto-anticorpos presentes no "pool" 4 em His-PEVA.....69

FIGURA 4.11 - Representação gráfica dos resultados de capacidade de retenção dos auto-anticorpos presentes no "pool" 5 em His-PEVA.....70

FIGURA 4.12 - Representação gráfica dos resultados de capacidade de adsorção dos auto-anticorpos presentes no "pool" 5 em His-PEVA.....70

FIGURA 4.13 - Simulação de uma seção de tratamento extracorpóreo para a remoção de auto-anticorpos utilizando o sistema de afinidade His-PEVA.....76

RESUMO

As doenças auto-imunes caracterizam-se pelo desenvolvimento de auto-anticorpos devido a um reconhecimento de certos componentes celulares do próprio organismo como antígenos. Essas doenças são normalmente tratadas com a administração de medicamentos que, em geral estabilizam a doença, mas não a eliminam. O tratamento extracorpóreo de pacientes com doenças auto-imunes tem sido investigado e pode ser por troca de plasma ou adsorção seletiva do auto-anticorpo. A troca de plasma possui um custo elevado além de expor o paciente ao risco de infecções. Devido a esses inconvenientes, a terapia de adsorção seletiva de auto-anticorpos tem sido a mais indicada. Como alternativa aos suportes existentes para o tratamento extracorpóreo de doenças auto-imunes utilizou-se histidina imobilizada em membranas de fibras ocas de álcool poli etileno vinílico. A fim de se determinar as melhores condições de retenção de IgG no módulo de filtração, estudou-se a influência das variáveis Q_F (vazão do filtrado)/Q_I (vazão de alimentação) e da concentração de IgG na alimentação na retenção de IgG no suporte através de um planejamento experimental. A variável Q_F/Q_I não apresentou efeito significativo na retenção de IgG e a capacidade de retenção de IgG aumentou de acordo com a concentração de IgG na alimentação. Testou-se a influência da variável Q_F/Q_I, mantendo-se a concentração de IgG na alimentação (5 mg/ml) constante, para plasma humano sadio e verificou-se também que Q_F/Q_I não apresentou um efeito relevante na retenção de IgG do suporte. Definiu-se Q_F/Q_I igual a 0,86, valor tradicionalmente usado em circulação extracorpórea, para os experimentos de filtração *in vitro* com soro de pacientes com doenças auto-imunes e investigou-se a retenção e adsorção dos auto-anticorpos anti-dsDNA, anti-SS-A/Ro, anti-Sm, anti-Sm/RNP e anti-cardiolipina em presença de tampão Hepes e Tris-HCl. Como resultado, houve adsorção de todos os auto-anticorpos testados em ambos tampões e para anti-SS-A/Ro, as maiores quantidades adsorvidas e retidas foram obtidas em presença de tampão Tris-HCl.

ABSTRACT

Among the pathogenic consequences related to autoimmune diseases is the expression of autoantibodies directed against a series of cellular components from the own organism. The utilization of corticosteroid and imunosupressive drugs are effective in relieving symptoms in most cases, however some patients respond poorly to prolonged imunosupression. As an alternative, the extracorporeal treatment for patients with autoimmune diseases has been suggested, which can be done by plasma exchange or selective adsorption of autoantibodies. Plasma exchange presents a high cost beside exposing the patient to the risk of infections. Due to these inconveniences, the autoantibodies selective adsorption therapy has been indicated. As an alternative to the already existing supports for the extracorporeal treatment of autoimmune diseases, L-histidine was immobilized onto poly(ethylene vinyl alcohol) hollow-fiber membranes. In order to verify the better conditions for autoantibody removal, an experimental design was made to study the influence of Q_F (filtrate flow rate)/Q_I (inlet flow rate) based on the initial IgG concentration. The results showed that Q_F/Q_I did not have statistical influence for IgG retention in this affinity membrane and the IgG retaining capacity increased according to the IgG concentration in the feedstream. The influence of Q_F/Q_I based on the IgG concentration in the feedstream (5 mg/ml) was also verified in human plasma and the same result as before was obtained. Thus, for the filtration *in vitro* experiments, the ratio Q_F/Q_I was kept constant at 0.86, classical value used in extracorporeal circuits, and the removal and adsorption of anti-dsDNA, anti-SS-A/Ro, anti-Sm, anti-Sm/RNP and anti-cardiolipin autoantibodies present in serum of patients with autoimmune diseases were investigated when Hepes and Tris-HCl buffer are utilized. As a result, these membranes were able to remove these autoantibodies if Hepes or Tris-HCl are used and specifically for the removal and adsorption of anti-SS-A/Ro, the better results were obtained with buffer Tris-HCl.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. A IMPORTÂNCIA DA TERAPÊUTICA DAS DOENÇAS AUTO-IMUNES

As doenças auto-imunes traduzem-se por distúrbios auto-imunitários em que o sistema imunológico se volta contra o próprio indivíduo e afetam de 5 a 7% da população mundial (BOITARD, 1991), podendo ser divididas em órgão específicas e órgão não-específicas (ROITT et al., 1987). O lupus eritematoso sistêmico está entre as doenças órgão não-específicas mais freqüentes, podendo os pacientes afetados apresentar vários tipos de auto-anticorpos. Dentre os auto-anticorpos presentes no soro desses pacientes destacamos o anti-Sm, anti-SS-A/Ro, anti-dsDNA, anti-Sm/RNP, anti-RNP e anti-cardiolipina pertencentes às classes de imunoglobulinas G, A e M.

Normalmente essas doenças são tratadas com a administração de medicamentos como corticosteróides e/ou imunossupressores que podem estabilizar a doença, mas não promovem a cura do paciente. Além da não eliminação da doença, um outro inconveniente destes tratamentos é a administração prolongada dessas drogas expondo o indivíduo a efeitos colaterais, entre eles a deficiência de resposta imune.

Para tratar a fase aguda da doença auto-imune, um método alternativo tem sido investigado nessas últimas três décadas em laboratório (*in vitro*) e em uso clínico, o qual remove do organismo os auto-anticorpos através do tratamento extracorpóreo do sangue do paciente, seja por troca de plasma ou por eliminação seletiva do auto-anticorpo (MALCHESKY et al., 1993).

A plasmaferese convencional ou troca de plasma tem sido muito praticada em uso clínico porém, alguns componentes do plasma do doador podem causar alergias, hipocalcemias, infecções virais e outras complicações no paciente. Devido a esses problemas, atualmente tem sido preferida a terapia de adsorção seletiva de auto-anticorpos como coadjuvante à administração de drogas

imunossupressoras (YAMAZAKI et al., 1989; IKOMONOV et al., 1992; BERTA et al., 1994).

Vários estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de métodos de adsorção seletiva visando a remoção das substâncias patogênicas do plasma. Entre os ligantes mais utilizados estão proteína A, fenilalanina e triptofano (SCHENEIDER et al., 1998). No entanto, esses ligantes apresentam várias desvantagens, entre elas destacamos as mais relevantes: o ligante proteína A não adsorve a subclasse IgG_3 além de possuir custo elevado, o triptofano é de uso limitado devido à sua afinidade por fibrinogênio e fenilalanina oferece menor adsorção de auto-anticorpos do que os outros ligantes citados (SCHENEIDER et al., 1998).

Devido a esses inconvenientes, o desenvolvimento de métodos seletivos de remoção de anticorpos deletéricos reveste-se de relevância visando o sucesso terapêutico de algumas doenças por auto-imunidade.

1.2. OBJETIVO E ETAPAS PROPOSTAS

Com o objetivo de contribuir com os métodos existentes para a remoção de auto-anticorpos, propôs-se a utilização do aminoácido histidina como ligante, uma vez que este mostrou seletividade quanto à adsorção de IgG humana (BUENO et al., 1995a).

Como no tratamento extracorpóreo é necessária a utilização de vazões elevadas, nesse trabalho utilizou-se membranas de fibras ocas como matriz para imobilização do ligante histidina com o objetivo de se tratar grandes volumes por unidade de tempo (BRANDT et al., 1988). A vazão comumente utilizada em sistemas de circulação extracorpórea varia entre 30 e 70 ml/min.

Como etapa inicial do trabalho, propôs-se a utilização de membranas de fibras ocas de álcool poli vinílico como suporte para a imobilização de histidina, por apresentarem diâmetro de poros bem maior (0,2 μm) do que as membranas de álcool poli etileno vinílico (0,05 μm), utilizadas por BUENO et al. (1995a, 1995b e 1996), devido a observação de alguns inconvenientes como um acúmulo de proteínas nas vizinhanças e no interior dos poros da membrana.

Ao longo do trabalho, tomou-se ciência de que as membranas de fibras ocas de álcool poli vinílico tiveram a sua produção descontinuada optando-se, desta forma, pela utilização de membranas de fibras ocas de álcool poli etileno vinílico, adaptando-se as condições operacionais a fim de evitar os inconvenientes apresentados por BUENO et al. (1995a, 1995b e 1996).

As etapas para a realização desse trabalho foram as seguintes:

1) Testar a adsorção dos auto-anticorpos em membranas de fibras ocas de álcool poli etileno vinílico contendo histidina imobilizada, His-PEVA.

2) Como os resultados obtidos na etapa 1 foram apenas qualitativos, propôs-se investigar as melhores condições para obtenção de resultados quantitativos de adsorção de auto-anticorpos em His-PEVA. Estudou-se, através de planejamento experimental, a retenção de IgG humana pura em His-PEVA, com o objetivo de avaliar a influência da concentração de alimentação de IgG (em uma faixa determinada) e da variação da razão Q_F/Q_I (vazão de filtrado/vazão de alimentação) na capacidade de retenção de IgG do suporte.

3) Estudar a retenção de IgG do plasma humano em experimentos de filtração em membranas His-PEVA para avaliar a influência da variação da razão Q_F/Q_I na presença de outras proteínas diferentes de IgG.

4) Investigar a adsorção e a retenção de auto-anticorpos em His-PEVA, de maneira quantitativa, através de experimentos de filtração utilizando-se amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes.

5) Avaliar, por fim, a adsorção e a retenção de IgG, IgM, IgA e a perda de albumina dos experimentos de filtração com auto-anticorpos.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão da literatura referente ao estudo da remoção de auto-anticorpos através de filtração por afinidade em membranas de fibras ocas foi dividida em três tópicos: doenças auto-imunes, imunoglobulinas e tratamento das doenças auto-imunes.

Essa revisão não tem o objetivo de explorar de maneira exaustiva e completa os tópicos aqui abordados, mas apontar os conhecimentos básicos e necessários para o entendimento desse trabalho.

2.1. DOENÇAS AUTO-IMUNES

Uma das propriedades do sistema imune é a sua habilidade em defender o organismo contra a invasão por agentes estranhos. Ao lado dessa capacidade para responder a estimulação antigênica, desenvolveu-se no sistema imunológico um outro mecanismo que impede seletivamente a produção de anticorpos contra os componentes do próprio organismo. Esta capacidade discriminativa é conhecida como "self tolerance" ou tolerância aos componentes próprios do organismo (ABBAS et al., 1997).

Numerosas observações, tanto de natureza clínica como experimental, têm mostrado que os mecanismos que mantêm a tolerância aos antígenos "self" podem ser perturbados, desencadeando-se, em consequência, processos auto-imunes (ABBAS et al., 1997). Quando isso ocorre, são produzidos auto-anticorpos, isto é, anticorpos capazes de reagir com componentes próprios ("self") do indivíduo (ROITT et al., 1987).

As doenças auto-imunes podem ser vistas na forma de um espectro (figura 2.1). Em um extremo estão as doenças órgão-específicas apresentando auto-anticorpos séricos órgão-específicos. Na outra extremidade do espectro estão as doenças órgão não-específicas, podendo ser exemplificada pelo lupus eritematoso sistêmico (L.E.S.).

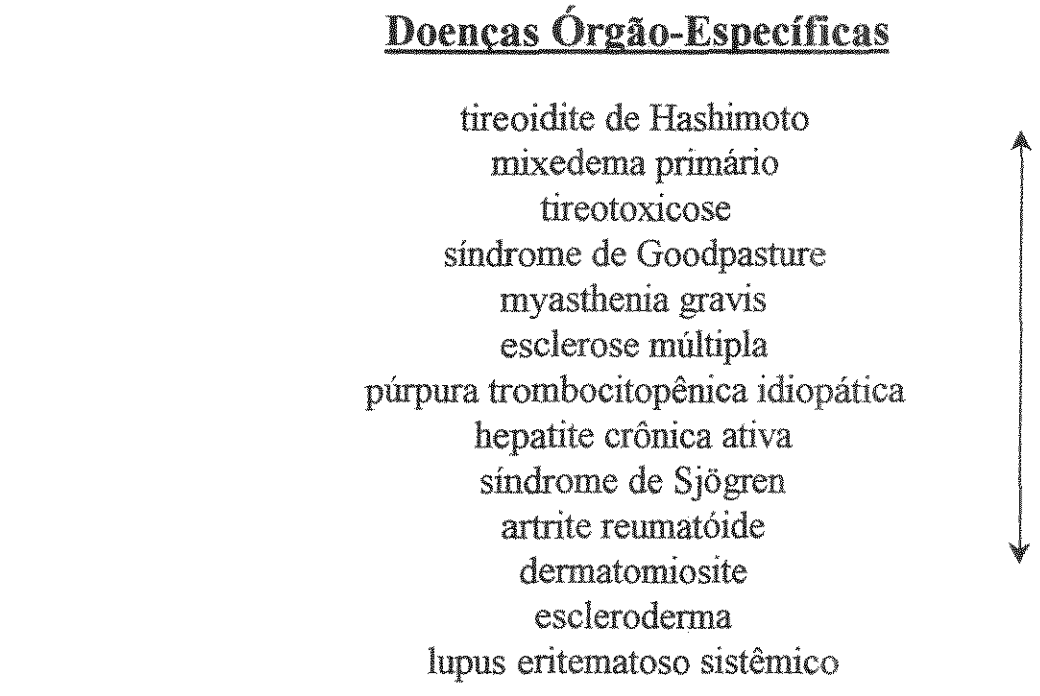


Fig. 2.1 - Espectro das doenças auto-imunes (Adaptado de ROITT et al., 1987).

No L.E.S., a maioria dos pacientes acometidos são do sexo feminino, principalmente as mulheres de cor negra com aproximadamente 30 anos de idade (FERREIRA et al., 1996). As alterações patológicas estão espalhadas e são, primariamente, lesões de tecido conjuntivo. São encontradas lesões na pele, nos glomérulos renais, juntas e vasos sanguíneos. Além disso, os elementos figurados do sangue estão freqüentemente afetados. Encontra-se uma variada coleção de auto-anticorpos, alguns dos quais reagem com o DNA e outros constituintes das células do organismo (ROITT et al., 1987).

2.2. IMUNOGLOBULINAS

O plasma humano consiste de numerosas proteínas (mais de 100) que estão presentes em diferentes concentrações e que exibem funções biológicas diferentes. De um conteúdo total de 60 mg/ml de proteínas, as presentes em maior quantidade são albumina (45 mg/ml) e imunoglobulina G (8-11 mg/ml) (BURNOUF, 1995). As imunoglobulinas serão a base desse estudo da remoção dos auto-anticorpos e portanto, serão abordadas com detalhe nesse tópico.

2.2.1. Imunoglobulinas: estrutura e função

O sistema imunológico consiste de uma variedade de moléculas e células das quais as imunoglobulinas e os linfócitos são as mais importantes. Há dois tipos de linfócitos, células T e células B. As células T estão envolvidas na imunidade celular e as células B sintetizam as moléculas que reagem com os antígenos: as imunoglobulinas (VLUG et al., 1989).

As imunoglobulinas são glicoproteínas compostas de 82 a 96% de proteínas e 4 a 18% de carboidratos. Basicamente cada molécula de imunoglobulina é composta de duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas unidas por ligações dissulfeto. As cadeias pesadas têm massa molecular de 50.000 Da e as cadeias leves, em torno de 23.000 Da (ROITT et al., 1987). Conseqüentemente, a molécula de IgG tem massa molecular de aproximadamente 150.000 Da (figura 2.2).

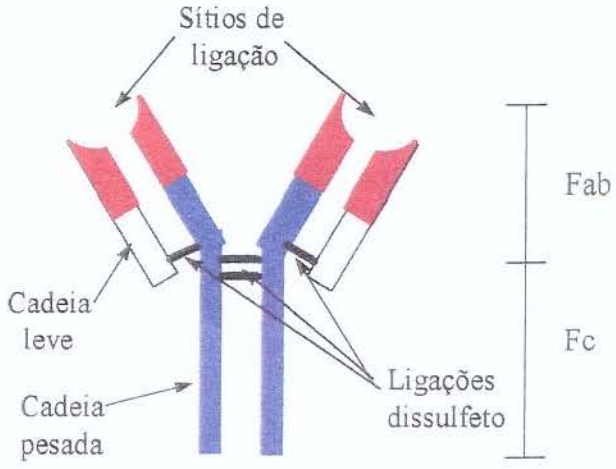


Fig. 2.2 - Estrutura do anticorpo (imunoglobulina G). (ACCONCI, 1998)

A molécula de imunoglobulina possui duas partes denominadas Fab e uma parte chamada Fc, ligadas por uma região flexível. A parte Fab possui a função de ligar-se ao antígeno e a Fc é o local de ligação de complementos e receptores e varia conforme a classe de Ig (VLUG et al., 1989).

Há diferentes formas de imunoglobulinas humanas e essa variedade é típica dos mamíferos em geral. Cinco classes de imunoglobulinas são conhecidas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, quatro subclasses de IgG (IgG_1, IgG_2, IgG_3 e IgG_4) e duas subclasses de IgA (IgA_1 e IgA_2) (VLUG et al., 1989).

As classes e as subclasses de imunoglobulinas são determinadas pelo tipo da sua cadeia pesada. As estruturas das cadeias pesadas diferem na sequência de aminoácidos, no comprimento das cadeias e no conteúdo de carboidratos. Os diferentes isotipos de Ig possuem funções biológicas diferentes. Segundo ROITT et al. (1987), as propriedades biológicas das imunoglobulinas nos seres humanos são:

- IgM: produzida nos primeiros estágios da resposta imune.
- IgG: a mais abundante do soro, produzida nos últimos estágios da resposta imune.
- IgA: é a mais abundante em secreções exócrinas (saliva, lágrimas, muco brônquico e muco

intestinal). Primeira linha de defesa contra antígenos bacterianos e virais.

- IgD: receptor de ligação (antígeno-células B), raros no soro, não havendo, até o momento, outra função biológica descrita.
- IgE: baixos níveis no soro, importante ao conferir proteção contra parasitas; possui função nas reações alérgicas.

Algumas propriedades físico-químicas das imunoglobulinas estão apresentadas na tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Algumas propriedades físico-químicas das imunoglobulinas.*

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Massa Molecular (kDa)	150	160	900	185	200
Teor de carboidratos %	2-3	7-11	12	9-14	12
Total de imunoglobulina no soro adulto %	80	13	6	0-1	0,002

*Modificado de ROITT et al., 1987.

As quatro subclasses de IgG diferem principalmente na região intermediária em termos de número de resíduos envolvidos e número de pontes dissulfeto. O comprimento e a flexibilidade da cadeia intermediária varia de acordo com a subclasse. A concentração relativa no soro é $IgG_1 > IgG_2 > IgG_3 > IgG_4$. Os níveis das subclasses de IgG no soro são influenciados por vários fatores como: idade, raça e sexo (VLUG et al., 1989). As subclasses de imunoglobulina G estão representadas na figura 2.3 e as suas propriedades estão apresentadas na tabela 2.2.

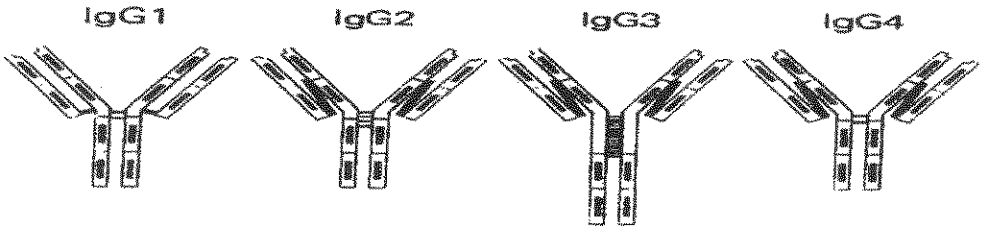


Fig. 2.3 - Esquema das diferentes subclasses de IgG (ROITT et al., 1987).

Tabela 2.2 - Propriedades das subclasses de IgG.*

	IgG_1	IgG_2	IgG_3	IgG_4
Massa Molecular (kDa)	146	146	170	146
Número de pontes dissulfeto intercadeias	2	4	11	2
Ponto Isoelétrico	8,6 ± 0,4	7,4 ±0,6	8,3 ± 0,7	7,2 ± 0,8
Concentração no soro adulto (mg/ml)	7,1 ± 1,7	3,0 ± 0,54	0,65 ± 0,31	0,6 ± 0,39

*Modificado de MARAN et al., 1997.

Há evidências de que a maioria dos auto-anticorpos presentes em pacientes com doenças auto-imunes órgão não-específicas são predominantemente das subclasses IgG_1 e IgG_3 MARAN et al., 1997).

2.2.2. Auto-anticorpos

O termo auto-anticorpo pode ser considerado como expressão genérica para a presença de anticorpos com especificidade para antígenos do próprio organismo. Os componentes nucleares reconhecidos por auto-anticorpos são membrana nuclear, cromatina, nucléolo, proteínas nucleares, partículas de ribonucleoproteínas e moléculas de DNA. Os auto-anticorpos são, em sua maioria,

imunoglobulinas G, A e M (NAPARSTEK, 1993). Os pacientes que apresentam doenças auto-imunes possuem em seu soro/plasma um ou mais tipos de auto-anticorpos. O L.E.S. foi escolhido para o estudo diante da variedade de auto-anticorpos que os pacientes acometidos por essa doença apresentam.

Auto-anticorpos em L.E.S.

Dentre os auto-anticorpos presentes em pacientes com lupus eritematoso sistêmico destacamos anti-DNA, anti-Sm/RNP, anti-Sm, anti-RNP, anti-SS-A/Ro e anti-fosfolipídios dirigidos, principalmente, contra componentes presentes no núcleo.

- Anticorpos anti-DNA

Os auto-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 (ss-DNA). O anti-dsDNA é o único auto-anticorpo claramente implicado na patogênese de L.E.S. com formação de imunocomplexos, deposição renal e inflamação local. Dos pacientes com L.E.S em atividade, 70% são positivos para o anti-dsDNA (NAPARSTEK, 1993). Em aproximadamente 5-15% de pacientes lúpicos, anti-dsDNA não é detectado. Em alguns casos os auto-anticorpos anti-DNA estão presentes, mas sua detecção através dos testes convencionais é dificultada pela sua ligação em complexos imunes (LAHITA, 1992).

- Anticorpos anti-Sm, anti-RNP e anti-Sm/RNP

O alvo dos auto-anticorpos anti-Sm é o antígeno Sm que é um complexo constituído por várias proteínas diferentes associadas à pequenos RNAs nucleares. Esse auto-anticorpo está presente quase que exclusivamente em pacientes com L.E.S., embora sua freqüência nessa doença

seja de apenas 15-30% (LAHITA, 1992).

Os auto-anticorpos anti-RNP dirigem-se contra ribonucloproteínas específicas presentes no núcleo. Em contraposição ao anti-Sm, o anti-RNP foi detectado em pacientes com uma variedade de doenças reumáticas, incluindo L.E.S., artrite reumatóide, síndrome de Sjögren e doença mista do tecido conjuntivo (LAHITA, 1992). Esses auto-anticorpos são detectados em 30 a 40% dos pacientes com L.E.S., freqüentemente em complexos com o anti-Sm (anti-Sm/RNP) (NAPARSTEK, 1993).

- Anticorpos anti-SS-A/Ro

Há duas classes de auto-anticorpos anti-nucleares presentes em pacientes com L.E.S. 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 Reichilin 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 também estar associada com o RNA variando em tamanho de 80 à 150 kDa. Os auto-anticorpos anti-SS-A/Ro são raramente encontrados em indivíduos normais ou em pacientes hospitalizados com doenças reumáticas, ocorrem em 96% dos pacientes com síndrome de Sjögren, 5-8% dos pacientes com doenças do tecido conectivo e em 62% dos pacientes com L.E.S. (LAHITA, 1992).

- Anticorpos anti-fosfolipídios

Podem ser detectados em 26% dos pacientes com L.E.S. O antígeno da reação é a cardiolipina, que está clinicamente associada ao desenvolvimento de trombose e trombocitopenia que em ginecologia estão relacionadas à morte intrauterina ou aborto. Os auto-anticorpos anti-

cardiolipina podem ser das classes IgM, IgG e IgA. A determinação de IgM é um indicador do diagnóstico do início da doença auto-imune, IgG é encontrada em estágios progressivos da doença e os auto-anticorpos do tipo IgA estão freqüentemente associados com a presença de IgG. A síndrome do anticorpo anti-fosfolipídio não é limitada a pacientes com L.E.S., podendo estar relacionada a outros processos auto-imunes (NAPARSTEK, 1993).

2.3. TRATAMENTO DAS DOENÇAS AUTO-IMUNES

O tratamento das doenças auto-imunes pode ser feito através da administração de medicamentos e/ou remoção das proteínas patogênicas do organismo por tratamento extracorpóreo podendo ser por troca de plasma ou por eliminação seletiva do auto-anticorpo.

No caso de doenças órgão específicas, onde os auto-anticorpos presentes são específicos de órgão, o emprego de medicamentos é geralmente adequado (ROITT et al., 1987). No caso de doenças órgão não-específicas, como por exemplo o lupus eritematoso sistêmico, medicamentos freqüentemente em doses elevadas ajudam a suprimir as lesões inflamatórias. Tentativas têm sido feitas para inibir a síntese de auto-anticorpos através de drogas imunossupressoras. O tratamento a longo prazo com determinadas drogas é ainda considerado perigoso e incerto quanto aos seus resultados (ROITT et al., 1987).

O risco da utilização prolongada dessas drogas está nos efeitos colaterais que essas podem provocar como: anemia, baixo nível de anticorpos no sangue, aumento do risco à infecções, osteosporose, pressão arterial elevada, catarata, úlcera gástrica, além da 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 há um método alternativo para a remoção dos auto-anticorpos do organismo a partir de um tratamento extracorpóreo do sangue do paciente, sendo por troca de plasma ou por remoção seletiva do auto-anticorpo (MALCHESKY et al., 1993).

Durante a troca de plasma (plasmaferese), todo o plasma do paciente é substituido pelo plasma de um indivíduo sadio. Através dessa técnica, os ativadores/mediadores auto-imunes, como os antígenos, anticorpos e complexos imunes são removidos da circulação sanguínea (MARGEL et al., 1993) sendo, contudo, considerado um método não-seletivo e não-específico (RICHTER et al., 1997). Como o plasma é totalmente substituído pelo do doador, são inseridas no paciente uma série de proteínas estranhas podendo causar alergias, infecções virais e outras complicações. Há riscos de transmissão de doenças como hepatite, AIDS, entre outras (MARGEL et al., 1993).

Assim, o método mais viável para o tratamento das doenças auto-imunes seria a remoção seletiva do auto-anticorpo do plasma através de um tratamento extracorpóreo evitando, assim, a perda dos componentes essenciais do plasma, além de eliminar a necessidade de substituição do plasma.

Princípio do tratamento extracorpóreo por adsorção seletiva de auto-anticorpo

Através da circulação extracorpórea, o sangue é retirado do paciente pela veia ante-cubital; em seguida, faz-se uma filtração ou uma centrifugação na qual promove-se a separação entre células sanguíneas e plasma. As células retornam imediatamente ao paciente e o plasma é posteriormente tratado através de adsorção específica em colunas contendo ligantes de afinidade imobilizados. A proteína de interesse (auto-anticorpo) é adsorvida no ligante enquanto que as moléculas não adsorvidas retornam ao paciente sem qualquer modificação, conforme exemplificado na figura 2.4.

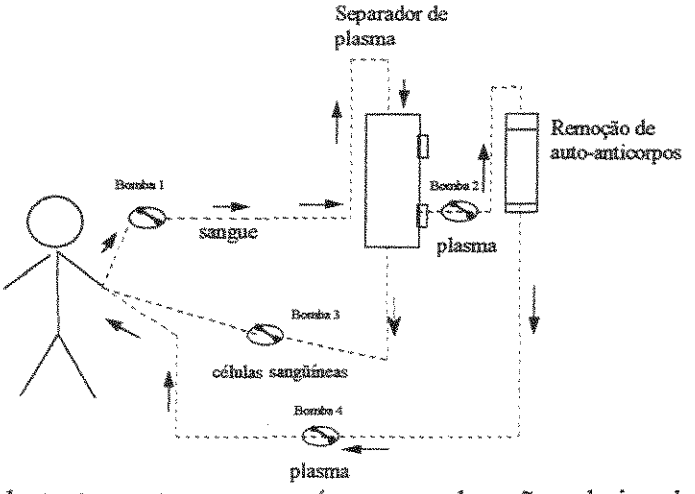


Fig. 2.4 - Princípio do tratamento extracorpóreo por adsorção seletiva de auto-anticorpo.

Vários adsorventes de afinidade contendo ligantes imobilizados tais como: proteína A, triptofano e fenilalanina, têm sido desenvolvidos para a remoção seletiva de auto-anticorpos do plasma humano (IKOMONOV et al., 1992).

Adsorventes de afinidade utilizados no tratamento extracorpóreo

Proteína A é um receptor Fc bacteriano encontrado na superficie da parede celular ou secretado pela maioria das linhagens de *Staphylococcus aureus*. É capaz de ligar-se à região Fc de espécies e subclasses de IgG. Os elementos de reconhecimento antigênicos estão localizados na parte Fab da molécula de IgG, conseqüentemente, a interação dos receptores Fc bacterianos com determinantes da região constante da cadeia pesada de IgG não influencia na habilidade do anticorpo em reconhecer o seu antígeno. Além de ligar-se à parte Fc da IgG, a proteína A liga-se, com menor afinidade, ao fragmento $F'(ab)_2$ da IgG humana, IgM, IgA e IgE (BOYLE et al., 1987). Devido a essa grande afinidade pela parte Fc de imunoglobulinas G, proteína A tem sido extensivamente utilizada em imunoensaios (CHEN et al., 1990).

Proteína A também tem sido utilizada como ligante na remoção de auto-anticorpos do plasma de pacientes com doenças auto-imunes como a púrpura trombocitopênica idiopática. A terapia de imunoadsorção com proteína A como ligante está também sendo investigada na

síndrome Guillain-Barré, lupus eritematoso e myasthenia gravis (BALINT et al., 1995).

Estudos realizados por BERTA et al. (1994) mostraram que a imunoadsorção com proteína A, através de tratamento extracorpóreo, em pacientes com myasthenia gravis possuindo resistência severa à drogas imunossupressoras, é uma técnica eficaz para a remoção dos auto-anticorpos. Pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática que são sensíveis à administração de drogas (MUROI et al., 1989; BALINT et al., 1991; SNYDER et al., 1992; ARBISER et al., 1995), pacientes com câncer (BANSAL et al., 1978; SNYDER et al., 1993), pacientes com vasculite sistêmica (ESNAULT et al., 1993) e pacientes com lupus eritematoso sistêmico (PALMER et al., 1991) também têm sido tratados pelo mesmo método obtendo-se uma situação clínica favorável.

Apesar da maioria dos estudos realizados no âmbito da remoção de auto-anticorpos, empregando proteína A como ligante, ter se mostrado promissor, KÄBISCH et al. (1994) observaram que o benefício desse suporte é questionável no tratamento de pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática utilizando-se proteína A-sílica, pois ocorreram reações adversas graves nos pacientes submetidos a essa terapia como febre e sinais de envolvimento renal. Além disso, há uma restrição de subclasses de IgG humana que se ligam à proteína A. Esse ligante promove a adsorção das subclasses IgG_1, IgG_2 e IgG_4 e, portanto, a subclasse IgG_3 não é adsorvida representando uma desvantagem, pois a maioria dos auto-anticorpos do tipo IgG presentes em doenças sistêmicas são das subclasses IgG_1 e IgG_3 (MARAN et al., 1997). Além disso, esta proteína não é específica para IgG, uma vez que têm sido observadas frações humanas de IgM, IgA e IgE interagindo com esse ligante (LINDMARK et al., 1983) e ainda pode apresentar toxicidade ao paciente em caso de desprendimento da matriz sólida.

O ligante proteína G, extraído da parede celular de um grupo de bactérias *G estreptococus* também reage com a parte Fc de imunoglobulinas e com a subclasse de IgG humana (IgG_3) que não adsorve em proteína A (MANDARO et al., 1987). IgM, IgA e IgD não adsorvem em proteína G indicando uma seletiva reatividade com IgG em contraste com a proteína A (BJÖRCK et al., 1984; AKERSTRÖM et al., 1985; BOYLE et al., 1987).

BAROCCI et al. (1993), compararam os suportes proteína A-sepharose e proteína G-

sepharose na remoção *in vitro* de auto-anticorpos do tipo IgG do soro de pacientes com insuficiência renal. Proteína G-sepharose mostrou-se mais eficiente, no entanto, apesar da proteína G apresentar várias vantagens, possui um custo elevado o que torna inviável a sua utilização.

Outro ligante utilizado no tratamento extracorpóreo por adsorção seletiva de auto-anticorpos é o anticorpo policlonal de carneiro anti-Ig humana imobilizado em gel de sepharose para o tratamento de pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática (RICHTER et al., 1997). Através da utilização desse suporte, foi possível remover quantidades similares das diferentes subclasses de IgG (SCHNEIDER et al., 1998).

O suporte para tratamento extracorpóreo desenvolvido por TERMAN et al. (1977), com DNA imobilizado em partículas de carvão vegetal foi eficaz na remoção de auto-anticorpos anti-DNA em animais e posteriormente, esse mesmo suporte foi testado em seres humanos (TERMAN et al., 1979). O suporte constituído de DNA imobilizado em filmes de colágeno polimerizado desenvolvido para a remoção específica do auto-anticorpo anti-DNA foi testado *in vitro* em plasma de pacientes com lupus eritematoso sistêmico (HABIB et al., 1984). Um polímero de poliestireno fosforilado também foi utilizado para promover a remoção de anti-DNA de soros de pacientes (LETOURNEUR et al., 1992). No entanto, nenhum desses suportes foi testado *in vivo*.

Os aminoácidos fenilalanina e triptofano imobilizados em géis de PVA (álcool poli vinílico) também tem sido utilizados no tratamento extracorpóreo de pacientes com doenças auto-imunes (YAMAZAKI et al., 1989). O triptofano imobilizado em gel de álcool poli vinílico foi utilizado na remoção de auto-anticorpos em pacientes com myasthenia gravis (YAMAZAKI et al., 1989) e fenilalanina, também imobilizada na mesma matriz, foi utilizada no tratamento de pacientes com lupus eritematoso sistêmico (SCHNEIDER et al., 1990) e com esclerose múltipla (YAMAZAKI et al., 1989). Ambos suportes eliminam auto-anticorpos do tipo anti-DNA, complexos imunes, anti-fosfolipídios e fator reumatóide através de interações hidrofóbicas. Outros auto-anticorpos como anti-RNP, anti-Sm e anti-SS-A/Ro são removidos em menor quantidade. Em comparação, o triptofano como ligante oferece uma afinidade maior na remoção de IgG, mas possui uma alta afinidade por fibrinogênio tornando o uso desse suporte limitado. Nenhuma dessas colunas é regenerável, não podendo ser reutilizadas em outras seções extracorpóreas (SCHNEIDER et al., 1998).

Trabalhos realizados por EL-KAK e VIJAYALAKSHMI (1992) e BUENO et al., (1995a, 1995b, 1996) mostraram que o aminoácido histidina imobilizado em géis de agarose e membranas de álcool poli etileno vinílico exibiram alta seletividade para a adsorção de IgG humana, apresentando possibilidade do emprego desse ligante em tratamento extracorpóreo de pacientes com doenças auto-imunes. Estudos experimentais *in vitro* foram efetuados para avaliar a remoção de anticorpos a partir do plasma de pacientes com síndrome anti-fosfolipídio, demonstrando que estes auto-anticorpos foram retidos em His-PEVA (DARNIGE et al., 1999). Quanto às vantagens desse ligante em relação a proteína A (comumente utilizada como ligante para remoção de auto-anticorpos), podemos citar o seu baixo custo, alta capacidade, facilidade de regeneração, boa estabilidade, baixa toxicidade em caso de desprendimento do ligante do suporte, além de apresentar afinidade pela subclasse 3 de IgG humana.

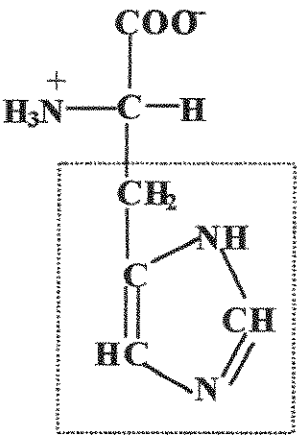
Assim, histidina imobilizada em suportes sólidos tem um grande potencial para aplicação no tratamento de doenças auto-imunes através da remoção seletiva dos auto-anticorpos por adsorção em membranas de afinidade.

Aminoácido histidina como ligante de afinidade

Desde o início dos anos 80, o aminoácido histidina tem sido utilizado como ligante pseudobioespecífico em cromatografia para a purificação de proteínas (VIJAYALAKSHMI, 1989) e remoção de endotoxinas de soluções destinadas a aplicação médica (MINOBE et al., 1988; EZZEDINE et al., 1993; ACCONCI e BUENO, 1997). Por exemplo quimiosina de vitelo, mixalina, protease ácida de *Aspergillus niger*, catechol-2-3-dioxigenase e imunoglobulina G têm sido purificadas em histidina imobilizada em diferentes suportes (VIJAYALAKSHMI, 1989).

A histidina tem muitas propriedades que a destaca entre os aminoácidos. Entre elas, hidrofobicidade branda, possibilidade de transferência de cargas fracas devido ao seu anel imidazol e seu átomo de carbono assimétrico. Essas propriedades sugerem que histidina, quando imobilizada em suportes sólidos, possa interagir com proteínas dependendo de condições como pH, temperatura e força iônica empregados (VIJAYALAKSHMI, 1989). A fórmula estrutural da

histidina está exemplificada na figura 2.5 e suas propriedades estão apresentadas na tabela 2.3.



Grupo R

Fig. 2.5 – Fórmula estrutural do aminoácido histidina.
(LEHNINGER et al., 1997)

Tabela 2.3 - Propriedades do aminoácido histidina.*

Massa Molecular (kDa)	pK_1 ($-COO^-$)	pK_2 ($-NH_3^+$)	pK_R (grupo R)	pI	Ocorrência em Proteínas, %
155	1,82	9,17	6,00	7,59	2,1

*Modificado de LEHNINGER et al., 1997.

A histidina é o único aminoácido que possui o pK do grupo R (6,00) próximo à neutralidade (LEHNINGER et al., 1997). Os grupamentos –COOH, $-NH_2$ e o grupamento lateral, o anel imidazol da histidina, contribuem nas interações hidrofóbicas ou de cargas induzidas com a biomolécula, mas a dessorção provocada por sais sugere que as interações eletrostáticas predominam.

EL-KAK e VIJAYALAKSHMI (1992) mostraram que histidina, quando imobilizada em géis de agarose, apresentou afinidade por IgG humana. Desse modo, foi possível purificar em pequena escala com alta especificidade esta proteína. Uma vez que o tratamento extracorpóreo do plasma é realizado a uma vazão de 30 a 70 ml/min, para se utilizar histidina como ligante, seria necessário a utilização de uma matriz que possibilitasse o uso de vazões elevadas, como as membranas de fibras ocas.

Vantagens da utilização de membranas sobre os géis convencionais em circulação extracorpórea

Embora a remoção seletiva de auto-anticorpos através de tratamento extracorpóreo utilizando membranas como suporte para imobilização do ligante (membranas de afinidade) ainda não tenha sido realizada *in vivo*, as vantagens apresentadas por essa técnica em relação às colunas de leito fixo têm estimulado a sua investigação *in vitro* (para posterior uso clínico).

As membranas foram introduzidas por BRANDT et al. (1988) como suporte para imobilização de ligantes em cromatografia de afinidade para a purificação de proteínas. O fator principal de separações baseadas em membranas é a ausência de difusão nos poros, que é a principal resistência de transporte em colunas de géis convencionais. Ao imobilizar ligantes nos poros da membrana, o transporte de massa ocorre principalmente através de convecção, minimizando as limitações difusionais nos poros ocorridas na utilização de géis convencionais (THÖMES et al., 1995).

A compressibilidade e a difusão nos poros dos géis convencionais limitam sua operação à vazões elevadas. Como resultado, sistemas que utilizam membranas possibilitam tratar grandes volumes por unidade de tempo, podendo-se operar a altas vazões sem o aparecimento de caminhos preferenciais, empregando-se pressões moderadas (BRANDT et al., 1988; THÖMMES et al., 1995).

A escolha correta da membrana e do ligante de afinidade é essencial ao processo de separação. As membranas devem ser microporosas, hidrofílicas, neutras e devem conter grupos funcionais que permitam a ativação, ser quimica e fisicamente estáveis e possuir baixo custo (CHARCOSSET, 1998).

A filtração por afinidade em modo tangencial em membranas de fibras ocas (figura 2.6) ocorre do seguinte modo: primeiro o módulo de filtração é equilibrado com uma solução tampão com pH e força iônica adequados para a adsorção da molécula desejada e, em seguida, a solução proteica diluída no tampão de equilíbrio é alimentada no módulo de filtração. As moléculas grandes, que não atravessam os poros da membrana são eliminadas na linha do retentado,

enquanto que as moléculas pequenas, inclusive a de interesse, atravessam os poros onde ocorrerá a adsorção da mesma no ligante imobilizado. As moléculas não adsorvidas são eliminadas pela linha do filtrado através de uma lavagem do módulo com o tampão de equilíbrio. Posteriormente, a molécula de interesse é dessorvida do suporte através de alterações na força iônica ou de pH do tampão, podendo ser recuperada se esta for o produto de interesse, ou descartada em caso de ser um contaminante.

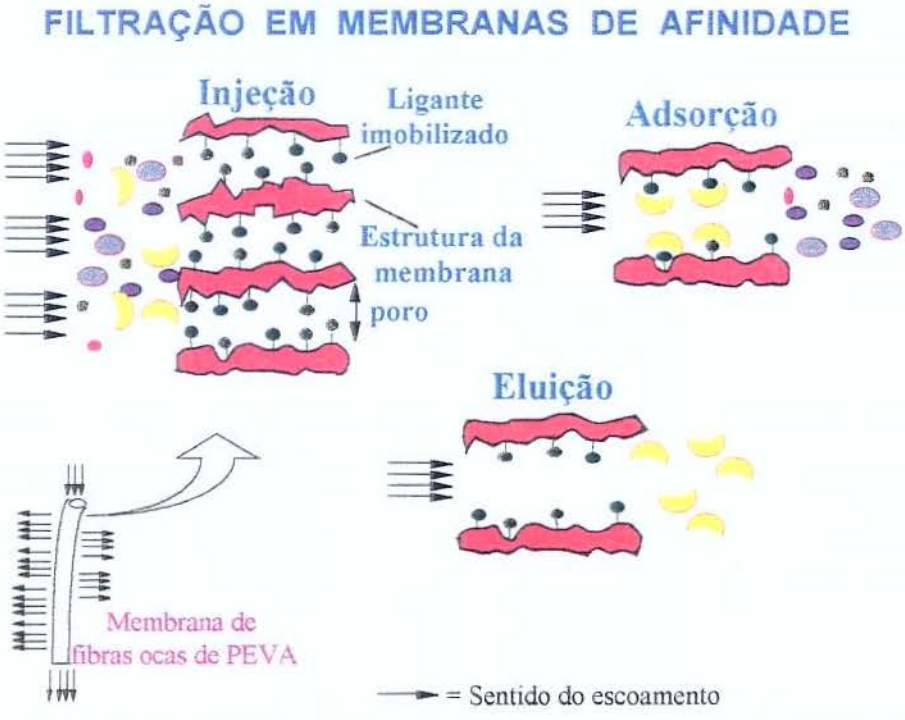


Fig. 2.6 – Esquema da filtração por afinidade em membranas de fibras ocas (ACCONCI, 1998).

Adsorção de IgG em histidina imobilizada em membranas de fibras ocas de álcool poli etileno vinílico (His-PEVA)

Trabalhos prévios realizados por BUENO et al.(1995a, 1995b e 1996) e por DARNIGE et al. (1999) mostraram que o aminoácido histidina imobilizado em membranas de fibras ocas de

álcool poli etileno vinílico exibiram alta seletividade para a adsorção de IgG humana e por anticorpos anti-fosfolipídio. Estudos experimentais *in vitro* foram efetuados para avaliar a remoção de anticorpos a partir do plasma de pacientes com síndrome anti-fosfolipídio, demonstrando que estes auto-anticorpos foram retidos em His-PEVA.

Estudos realizados por HAUPT et al. (1995) mostraram que IgG é adsorvida em histidina através da sua parte Fab e que a adsorção de IgG humana em His-PEVA é possível em vários tampões sendo que a quantidade e as subclasses de IgG adsorvida dependem da natureza dos tampões utilizados. As maiores capacidades de adsorção foram obtidas com os tampões Hepes e Mops a pH 7,0 e 6,5, respectivamente.

A eluição total da IgG adsorvida em His-PEVA pode ser realizada através de condições brandas, adicionando-se sal ao tampão de equilíbrio ou através de gradiente decrescente de pH (BUENO et al., 1995a). Isto indica que a interação entre IgG e histidina imobilizada seja governada por forças eletrostáticas, embora uma análise termodinâmica das interações tenha revelado que as forças hidrofóbicas também são importantes.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

L-Histidina, 1,4 butanodiol diglicidil éter, borohidrato de sódio, ácido hidroetilpiperazinaetanosulfônico (Hepes), albumina de soro bovino (BSA), ácido morfolinopropanosulfônico (Mops) e glicerol foram obtidos da Sigma (EUA). IgG humana pura (γ-globulina) foi obtida da Armour Pharmaceutical Company (EUA) e da Sigma (EUA). Coomassie brilliant blue-G250 e ácido etilenodiamina tetracético (EDTA) foram adquiridos da Bio-Rad (EUA). Acetato de sódio, ácido acético glacial, carbonato de sódio anidro, formaldeído e ácido fosfórico foram utilizados da marca Ecibra (Br). Cloreto de sódio, hidróxido de sódio, sulfato de cobre e tris (hidroximetil aminometano) foram obtidos da Merck (EUA). Glutaraldeído foi obtido da Reagen (Br) e álcool etílico absoluto da marca Labsynth (Br).

Tiras de Tampão de SDS ("buffer strip"), gel de eletroforese (gradiente de concentração 4-15%), marcadores de baixo peso molecular foram obtidos da Pharmacia (EUA) e nitrato de prata pela Fisher Scientific Company (EUA).

Água ultra-pura para a preparação de todas as soluções foi obtida através da utilização do equipamento Milli-Q (Millipore, EUA). Plasma humano sadio foi doado por Roberta Cristina Arena Ventura (idade 24 anos) e Elcimar da Silva Nóbrega (idade 26 anos).

Amostras de soros de pacientes com doenças auto-imunes foram obtidas e quantificadas pelo Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. A quantificação dos auto-anticorpos: anti-Sm/RNP, anti-Sm, anti-SS-A/Ro, anti-dsDNA e anti-cardiolipina foi feita através do teste ELISA, utilizando-se kits Kallestad Microplate EIA doados pela Sanofi Pasteur (EUA). Reagente e calibrador de IgG, IgM, IgA e albumina foram obtidos da Beckman (EUA) para a realização das análises de nefelometria.

Para a realização dos experimentos foram utilizadas membranas de fibras ocas de álcool

poli etileno vinílico (PEVA) e álcool poli vinílico (PVA) retiradas respectivamente de seus cartuchos comerciais da marca Kuraray (Japão). As membranas de fibras ocas de PEVA apresentavam diâmetro interno de 200 μm e externo de 240 μm, e diâmetro de poro de 0,05 μm. As membranas de fibras ocas de PVA apresentavam um diâmetro interno de 300 μm e externo de 500 μm e diâmetro de poro de 0,2 μm.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas nos experimentos realizados com IgG humana pura foi feita medindo-se a absorbância à 280 nm no espectrofotômetro (Hitachi U2000). A concentração de proteínas nos experimentos com o plasma humano e com amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976), utilizando albumina de soro bovino como proteína de referência.

3.2.2. Teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Pelo teste ELISA foi possível realizar a quantificação dos auto-anticorpos de amostras séricas de indivíduos com doenças auto-imunes.

O procedimento foi feito de acordo com o protocolo do kit Sanofi Diagnostics Pasteur (EUA), utilizando-se uma leitora para enzima imunoensaio da Sanofi Pasteur (EUA). Os auto-anticorpos que foram dosados através desses kits são: anti-SS-A/Ro, anti-Sm/RNP, anti-Sm, anti-dsDNA e anti-cardiolipina, devido a sua alta frequência em lupus eritematoso sistêmico.

Princípio do método: As microcubas de cada kit contêm o reagente específico (antígeno). Durante a primeira incubação, o auto-anticorpo presente no soro ou plasma previamente diluido

no diluente da amostra liga-se ao antígeno. As microcubas são posteriomente lavadas com tampão para remover os componentes do soro/plasma não reagidos. Um conjugado de enzima-anticorpos monoclonais do tipo IgG, IgM e IgA liga-se na segunda incubação à superfície do auto-anticorpo reagido. Após uma lavagem com o respectivo tampão de lavagem, faz-se uma incubação das microcubas com uma solução de substrato. Posteriormente, com a adição de uma solução "stopping" ocorre o término da reação e promove-se o pH apropriado para o desenvolvimento da 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 de acordo com a Organização Mundial de Saúde. Os resultados são obtidos em unidade internacional de auto-anticorpo (IU) por mililitro. O erro inerente ao método é de, aproximadamente, 5%.

3.2.3. Dosagem de IgG, IgA, IgM e albumina por nefelometria

Através de nefelometria fez-se a dosagem dos níveis de IgG, IgA, IgM e albumina conforme descrito no manual do nefelômetro (Protein Array System, Beckman, EUA).

Princípio do método: o nefelômetro mede a intensidade do espalhamento da luz obtida por partículas em suspensão na solução medida. Essas partículas são formadas por uma reação de imunopreciptação que ocorre quando um anticorpo específico é colocado em contato com o antígeno resultando na formação de complexos e provocando uma conseqüente mudança na intensidade da luz. O nefelômetro converte o valor da intensidade do espalhamento da luz em unidades de concentração (mg/ml).

3.2.4. Ativação das membranas de PVA e PEVA finamente cortadas

As membranas de fibras ocas de PVA e PEVA foram retiradas respectivamente dos seus cartuchos comerciais e finamente cortadas em pedaços de aproximadamente 2-5 mm de comprimento. Em seguida as mesmas foram lavadas com NaOH a 0,6 M e ativadas com 1,4 butanodiol diglicidil éter utilizando-se o procedimento descrito por BUENO et al. (1995a).

3.2.5. Imobilização de histidina em membranas de PVA e PEVA

Realizou-se a imobilização do aminoácido histidina fazendo-se primeiramente a lavagem com Na_2CO_3 a 1,5 M das membranas previamente ativadas. Posteriormente, adicionou-se às fibras uma solução de histidina (20%) e deixou-se por 24 horas em agitação à 60°C conforme descrito em BUENO et al. (1995a). As membranas assim obtidas foram denominadas His-PVA e His-PEVA.

3.2.6. Cromatografia em coluna com membranas His-PVA e His-PEVA finamente cortadas

As membranas His-PVA foram introduzidas em uma coluna cromatográfica de forma a fornecer volume de leito (Vl) de 1 ml para os experimentos com IgG pura e 8 ml para os experimentos com o plasma humano sadio. As membranas His-PEVA também foram introduzidas em uma coluna de forma a fornecer volume de leito (Vl) de 3 ml para os experimentos com IgG pura.

A fase móvel foi alimentada na coluna cromatográfica através de uma bomba peristáltica na vazão de 0,4 ml/min. Primeiramente, a coluna foi equilibrada com solução tampão (Hepes a 25 mM a pH 7,0 ou Mops a 25 mM a pH 6,5) de acordo com o experimento. Para a injeção, 2 mg de IgG humana pura foram diluídos em 2 ml do tampão de equilíbrio para os ensaios com γ-globulina

e para os experimentos com plasma humano foram diluídos 500 µl de plasma em 2 ml de tampão de equilíbrio.

Finalizada a injeção de IgG, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de equilíbrio com o intuito de eliminar as proteínas não adsorvidas nas membranas de afinidade. Para os experimentos com IgG pura, as proteínas adsorvidas foram eluídas em tampão acetato de sódio a 25 mM, contendo 1 M de NaCl a pH 4,0. Nas cromatografias em His-PVA com o plasma sadio, a eluição foi realizada gradativamente utilizando tampão Hepes a 25 mM contendo 0,1 M de NaCl a pH 7,0 e tampão Hepes a 25 mM contendo 1 M de NaCl a pH 7,0.

A corrente de saída da coluna, durante todo o experimento, esteve conectada a um monitor de absorbância, o qual emitia sinais de forma contínua ao aquisitor de dados que os enviava a um microcomputador que, por sua vez, traçava um cromatograma referente aos dados emitidos. Dessa forma, pode-se observar a evolução do perfil cromatográfico. A corrente de saída foi coletada em frações individuais com um volume de 2,4 ml. A absorbância de cada fração foi medida em um espectrofotômetro à 280 nm para os experimentos com IgG pura e à 595 nm através do método de BRADFORD (1976) para os experimentos com plasma humano.

Após a etapa de eluição, fez-se a regeneração da coluna com NaOH a 25 mM, seguida de lavagem com água ultrapura. Finalizado o experimento, foi realizado o balanço de massa através do qual avaliou-se a adsorção de IgG nas membranas de afinidade.

3.2.7. Eletroforese Phast-System Pharmacia SDS-PAGE

Com as frações de lavagem e eluição obtidas na cromatografia com o plasma humano sadio em His-PVA, foi feita uma eletroforese para detectar as proteínas presentes.

A eletroforese foi realizada conforme o procedimento descrito no manual de instruções que acompanha o aparelho Phast-System Pharmacia, utilizando-se um gel de gradiente 4-15%. Terminada a eletroforese, foi feita a coloração do gel com nitrato de prata, de acordo com o descrito no manual do equipamento.

3.2.8. Experimentos com amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes em membranas de fibras ocas de PEVA finamente cortadas

Seleção de soros contendo auto-anticorpos

Os soros de pacientes foram selecionados do banco de soros do Laboratório de Imunologia Clínica da Unicamp utilizando-se o critério de concentração de auto-anticorpos presentes em cada amostra (previamente determinada e registrada no laboratório).

Cromatografia em coluna com membranas His-PEVA finamente cortadas para experimentos com amostras séricas contendo auto-anticorpos

As membranas de PEVA com histidina imobilizada foram introduzidas em uma coluna cromatográfica de forma a fornecer um volume de leito de 12 ml para os experimentos com amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes.

Através de uma bomba peristáltica, a fase móvel foi alimentada na coluna cromatográfica a uma vazão de 0,4 ml/min. Primeiramente a coluna foi equilibrada com tampão Hepes a 25 mM a pH 7,0. Em seguida, 500 µl do soro do paciente foram diluídos em 2ml de tampão de equilíbrio e posteriormente injetados na coluna.

Finalizada a injeção, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de equilíbrio com o intuito de eliminar todas as proteínas não adsorvidas em His-PEVA. As proteínas adsorvidas foram eluídas em tampão Hepes a 25 mM a pH 7,0 contendo 1 M de NaCl. Após a etapa de eluição, fez-se regeneração da coluna com NaOH a 25 mM, seguida de lavagem com água ultrapura. O experimento foi realizado conforme a figura 3.1.

A corrente de saída da coluna, durante todo o experimento, esteve conectada a um monitor de absorbância, o qual emitia sinais de forma contínua a um aquisitor de dados que os enviava a

um microcomputador que traçava um cromatograma referente aos dados emitidos. Dessa forma, pode-se observar a evolução do perfil cromatográfico. A corrente de saída foi coletada em frações cada qual com um volume de 3,2 ml. A absorbância de cada fração foi medida em um espectrofotômetro à 280 nm. Posteriormente, juntou-se as frações de cada pico e mediu-se o volume total de cada um deles.

Finalizado o experimento, verificou-se a adsorção dos auto-anticorpos em His-PEVA através do teste ELISA.

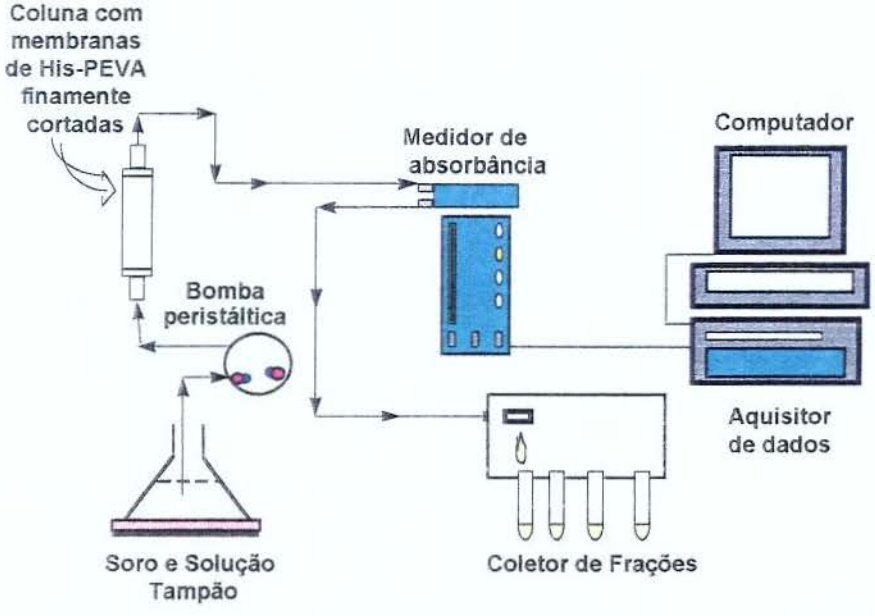


Fig. 3.1 - Esquema dos experimentos cromatográficos realizados com amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes (ACCONCI, 1998).

3.2.9. Experimentos utilizando o módulo de membranas de fibras ocas de PEVA

Utilizou-se o módulo de filtração para ensaios com imunoglobulina G pura, com plasma humano sadio e para os experimentos com "pools" de soros de pacientes com doenças auto-

imunes.

Construção do módulo

Foram retiradas duzentas fibras ocas de PEVA de um cartucho comercial da marca Kuraray (Japão). Essas membranas foram introduzidas em um tubo de vidro préviamente construído contendo duas saídas laterais e suas extremidades foram fixadas utilizando-se uma resina epóxi. Na figura 3.2 está esquematizado o módulo construído.

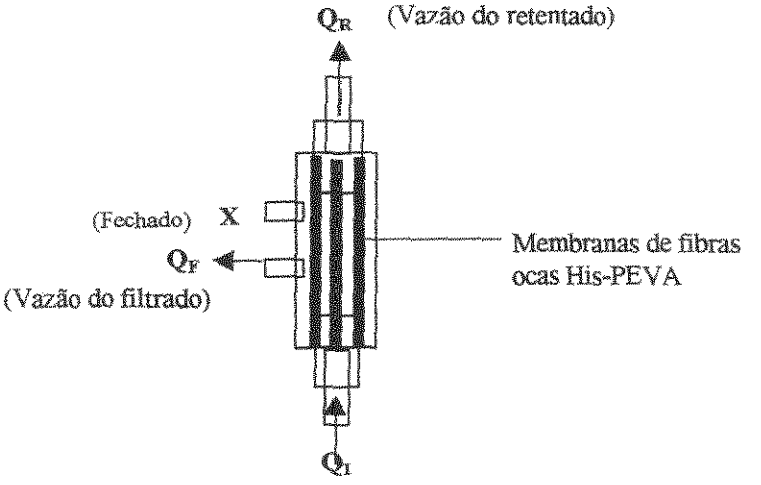


Fig. 3.2 - Esquema do módulo de membranas de fibras ocas de PEVA.

A área das membranas contidas no módulo construído foi calculada através de:

$$A = 2\pi r_i LN \qquad \text{Equação 3.1}$$

onde:

A = área superficial interna das membranas;

r_i = raio interno da membrana (100 μm);

L = comprimento das membrana de fibras ocas (4 cm);

N = número de fibras (200);

Através da equação 3.1 calculou-se a área das membranas e obteve-se 50,3 cm^2 e através da equação 3.2, calculou-se o volume das membranas:

$$V = \pi(r_o^2 - r_i^2)LN \qquad \text{Equação 3.2}$$

onde:

V = volume ocupado pelas membranas;

r_0 = raio externo da membrana (120 μm);

r_i = raio interno da membrana (100 μm);

L = comprimento das membrana de fibras ocas (4 cm);

N = número de fibras (200);

O volume ocupado pelas membranas foi de 0,11 cm^3.

Ativação das membranas de PEVA contidas no módulo

As membranas de fibras ocas de PEVA contidas no módulo foram inicialmente lavadas com água ultrapura e depois com um volume de 50 ml de uma solução de 0,6 M de hidróxido de sódio. A lavagem foi realizada em quatro sentidos: frontal, "intraluminal", espaço concha e "backflushing", como mostrado na figura 3.3.

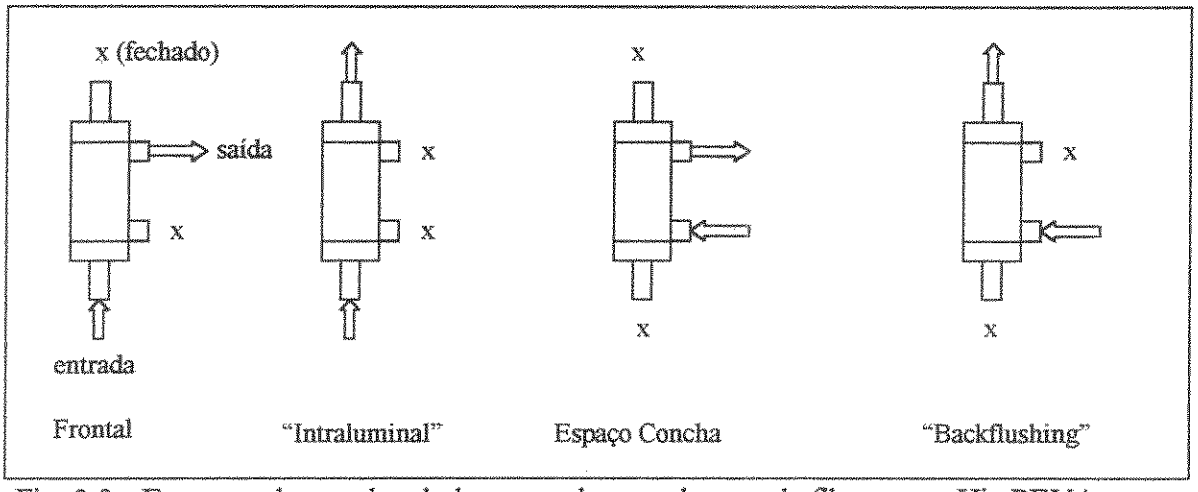


Fig. 3.3 - Esquema dos modos de lavagem das membranas de fibras ocas His-PEVA.

Após a etapa de lavagem da membrana com NaOH a 0,6 M, iniciou-se a ativação em uma capela utilizando uma solução contendo 20 ml de 1,4 butanodiol diglicidil éter e 20 ml de NaOH a 0,6 M com uma concentração de 2 mg/ml de borohidrato de sódio conforme descrito em BUENO et al. (1995b). Essa solução permaneceu em agitação durante todo o experimento e foi bombeada através do módulo durante 8 horas de acordo com a figura 3.4. Terminada a reação, lavou-se o módulo com água ultrapura por todos os modos (frontal, "intraluminal", espaço concha e "backflushing") para a eliminação do 1,4 butanodiol diglicidil éter que não reagiu.

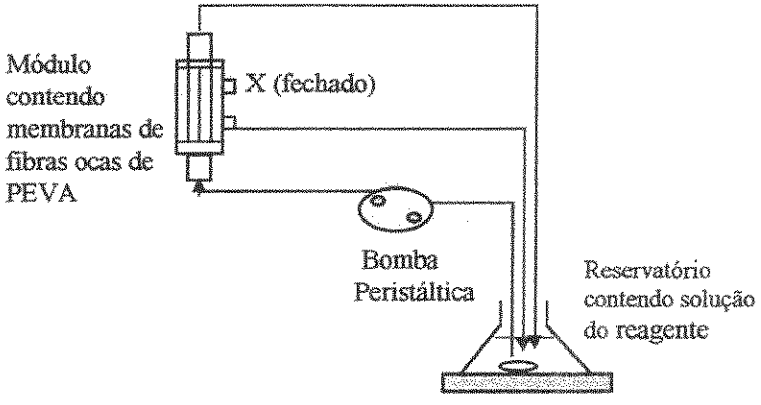


Fig. 3.4 - Esquema da montagem experimental para a ativação das membranas de fibras ocas com 1,4 butanodiol diglicidil éter.

Imobilização de L-histidina em membranas de fibras ocas contidas no módulo

O procedimento para imobilização de L-histidina em membranas de fibras ocas de PEVA foi feito conforme realizado em BUENO et al. (1995b). Duas soluções contendo Na_2CO_3 a uma concentração de 1M foram preparadas em um volume de 30 ml cada. Em uma das soluções foi acrescentada L-histidina a 20% (p/v) e NaOH até atingir o pH 11,0. Foi realizada a lavagem do módulo conforme a figura 3.3, com a solução de Na_2CO_3 para retirar toda a água. Após esta lavagem, a solução contendo L-histidina foi passada pelo módulo em modo frontal de acordo com a figura 3.5. A solução contendo L-histidina foi mantida em agitação durante todo o experimento de imobilização e após 24 horas foi trocada por uma nova solução previamente preparada. O experimento teve a duração total de 48 horas e foi realizado à temperatura ambiente. As membranas assim obtidas foram denominadas His-PEVA.

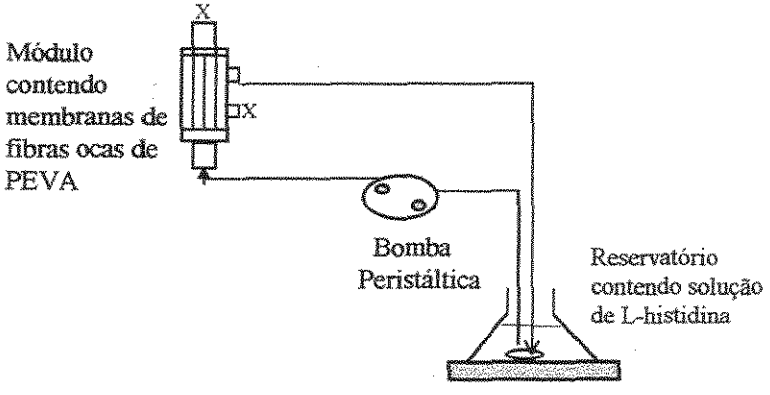


Fig. 3.5 - Esquema utilizado para a imobilização de L-histidina em membranas de fibras ocas de PEVA.

Verificação da imobilização de L-histidina no módulo de membranas de PEVA por sulfato de cobre

Utilizou-se uma solução de sulfato de cobre para verificar de maneira qualitativa se histidina foi imobilizada em membranas de fibras ocas de PEVA.

Em modo frontal, a solução de sulfato de cobre a 50 mM foi passada pelo módulo. A presença de uma forte coloração azul indicou que histidina foi imobilizada nas membranas. Em seguida, lavou-se o módulo com água ultrapura para eliminar o cobre que não formou ligações de coordenação com a histidina imobilizada. Injetou-se uma solução com EDTA a 50 mM a pH 6,5 para retirar o cobre que formou ligações de coordenação com a histidina, regenerando-se as membranas. Posteriormente, lavou-se as membranas com água ultrapura por todos os modos para eliminar todo EDTA e cobre restantes. A montagem experimental é mostrada na figura 3.5.

Experimentos de filtração com IgG humana pura utilizando o módulo membranas His-PEVA

Esses experimentos de filtração têm por objetivo verificar a influência da concentração de alimentação de IgG e da razão entre a vazão do filtrado (Q_F) e a vazão de alimentação (Q_I) na retenção de IgG em His-PEVA.

Uma solução de concentração conhecida de IgG foi alimentada através de uma bomba peristáltica (Digi-staltic Masterflex-bomba 1) no módulo, a uma vazão de alimentação (Q_I), em modo tangencial com recirculação do retentado e do filtrado.

A vazão de alimentação (Q_I) e a vazão do filtrado (Q_F) foram mantidas constantes usando 2 bombas peristálticas para fixar a razão Q_F/Q_I entre 0,5 e 0,86, conforme o experimento.

Fixando-se a vazão do filtrado, o tempo de residência pode ser calculado pela seguinte expressão:

$$t_r = \frac{V}{Q_F} \qquad \text{Equação 3.3}$$

onde:

t_r = tempo de residência;

V = volume ocupado pelas membranas (0,11 cm^3);

Q_F= vazão do filtrado (0,6 ml/min);

O tempo de residência calculado foi de 11 segundos.

O tempo de recirculação foi de uma hora. A concentração de IgG foi monitorada por um detector UV (Econo UV Bio-Rad) localizado na linha do filtrado durante os experimentos de filtração, conforme mostrado na figura 3.6. Terminado o experimento, fez-se a regeneração do módulo com uma solução de NaOH a 1,5 M. A lavagem do módulo foi realizada nos modos esquematizados na figura 3.3.

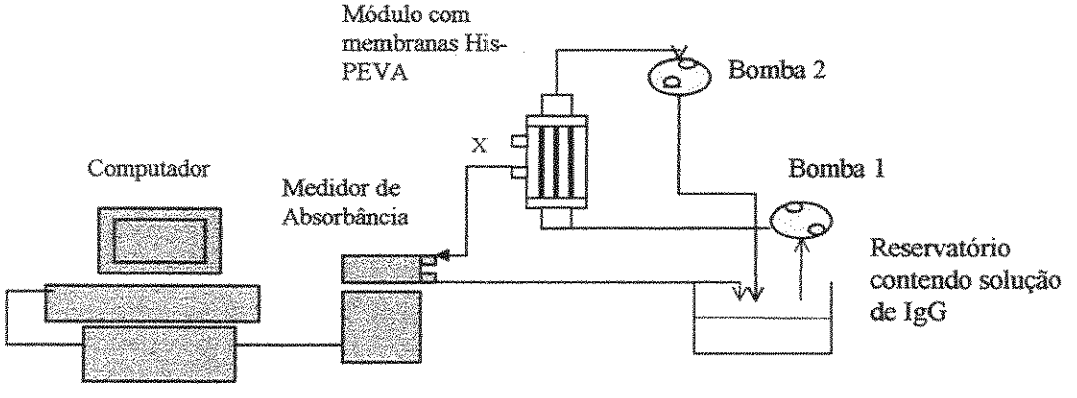


Fig. 3.6 - Esquema de montagem experimental dos experimentos de filtração com imunoglobulina G.

Planejamento Experimental

Utilizou-se das técnicas de planejamento experimental apresentadas por BARROS NETO et al. (1995) para determinar a influência do fator de diluição da concentração de IgG na alimentação e da variação da razão entre a vazão do filtrado e a vazão de alimentação (Q_F/Q_I) na retenção de IgG em His-PEVA. Foram determinados os fatores que seriam mantidos constantes e os que poderiam variar e as respostas a serem analisadas.

O tempo de residência e conseqüentemente a vazão do filtrado foram mantidos constantes. A vazão do filtrado foi calculada conforme BUENO et al. (1996), onde é descrito que o tempo de residência limite para adsorção de IgG humana em membranas His-PEVA ocorre entre 10 e 12 segundos e em tempos de residência menores que 10 segundos há uma colmatagem ou a formação de uma camada de polarização na superfície da membrana. Baseado nestes resultados foi calculada a vazão do filtrado como sendo 0,6 ml/min, resultando em um tempo de residência de aproximadamente 11 segundos.

As variáveis estudadas foram: a razão entre vazão de filtrado e a vazão de alimentação (Q_F/Q_I), que estiveram entre 0,5 e 0,86 e a concentração de IgG na alimentação.

As concentrações de IgG na alimentação foram determinadas baseando-se nos valores encontrados no plasma humano sadio. Através da literatura (HOFFMAN, 1970) escolheu-se a faixa entre 2,5 e 7,5 mg de IgG/ml. As concentrações de IgG na alimentação e concentração final de IgG (após 1 hora de recirculação) foram obtidas através de medida de absorbância à 280 nm. A resposta analisada foi a capacidade de retenção de IgG no suporte.

As condições do planejamento experimental foram determinadas conforme a tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Condições determinadas para a realização do planejamento experimental.

Fatores	Condição	Valores
Tempo de residência	constante	11 segundos
Vazão filtrado	constante	0,60 ml /min
Concentração de IgG na alimentação	variável	2,50 - 7,50 mg/ ml
razão Q_F/Q_I	variável	0,50 a 0,86
Tempo de recirculação	constante	1 h

No planejamento experimental 2^2, os sinais (+) e (-) foram utilizados para designar os níveis superior e inferior, respectivamente. Para os valores da relação Q_F/Q_I temos 0,5 para o sinal negativo (-) e 0,86 para o sinal positivo (+). O mesmo ocorre para a concentração inicial de IgG igual a 2,5 mg/ml (-) e 7,5 mg/ml (+). As condições para o ponto central recebem a conotação de zero (0). Desta forma obtemos um planejamento fatorial 2^2, como mostrado na tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Planejamento experimental linear 2^2 para estudar os efeitos da concentração de IgG na alimentação e da razão Q_F/Q_I na retenção de IgG em His-PEVA.

ENSAIO	Razão Q_F/ Q_I	Concentração de IgG na alimentação (mg/ml)
1	0,50 (-)	2,50 (-)
2	0,86 (+)	2,50 (-)
3	0,50 (-)	7,50 (+)
4	0,86 (+)	7,50 (+)
5	0,68 (0)	5,00 (0)
6	0,68 (0)	5,00 (0)
7	0,68 (0)	5,00 (0)

Realizou-se outro planejamento experimental 2^2 com o intuito de obter uma otimização do processo, conforme as condições exemplificadas na tabela 3.3, utilizando-se uma concentração de IgG na alimentação, cujo o nível de IgG poderia também abranger os pacientes com doenças auto-imunes.

Tabela 3.3 - Condições determinadas para a realização do segundo planejamento experimental.

Fatores	Condição	Valores
Tempo de residência	constante	11 segundos
Vazão filtrado	constante	0,60 ml /min
Concentração de IgG na alimentação	variável	7,5 - 25,0 mg/ml
razão Q_F/Q_t	variável	0,50 a 0,86
Tempo de recirculação	constante	1 h

Dessa forma obtivemos um segundo planejamento fatorial 2^2, realizado nas mesmas condições do primeiro com exceção dos limites inferior e superior da concentração de IgG na alimentação, fixados em 7,5 mg/ml e 25,0 mg/ml respectivamente como mostrado na tabela 3.4.

Tabela 3.4- Planejamento experimental linear 2^2 para estudar os efeitos da concentração de IgG na alimentação e da razão Q_F/Q_t na retenção de IgG em His-PEVA.

ENSAIO	Razão Q_F/ Q_t	Concentração de IgG na alimentação (mg/ml)
1	0,50 (-)	7,50 (-)
2	0,86 (+)	7,50 (-)
3	0,50 (-)	25,00 (+)
4	0,86 (+)	25,00 (+)
5	0,68 (0)	16,25 (0)
6	0,68 (0)	16,25 (0)
7	0,68 (0)	16,25 (0)

Cálculo da capacidade de retenção de IgG: Os valores de capacidade de retenção de IgG nas membranas His-PEVA, para os dois planejamentos experimentais, foram obtidos segundo a seguinte expressão:

$$CR = \left[\frac{(CAD - CF)}{A}\right] \times (V_r) \qquad \text{Equação (3.3)}$$

onde:

Vr = volume total do reservatório (10 ml);

A = área superficial interna das membranas, calculadas na equação 3.1 (50,3 cm^2);

CAD = concentração de IgG na alimentação após sua diluição no interior das membranas (mg/ml);

CF = concentração final de IgG após 1 h de recirculação (mg/ml);

Ajuste dos modelos empíricos: O modelo polinomial linear foi ajustado em relação aos dados experimentais obtidos utilizando-se o método dos mínimos quadrados com o auxílio do programa computacional Statistica da empresa Statsoft (EUA), segundo análise conjunta de R^2 e teste F.

Experimentos de filtração do plasma humano sadio utilizando o módulo membranas His-PEVA

Os experimentos com plasma humano sadio foram realizados com o intuito de confirmar os resultados obtidos com o planejamento experimental para IgG humana pura e de verificar se alguma mudança com relação a capacidade de retenção de IgG ocorreria na presença de outras proteínas diferentes de IgG.

Primeiramente, lavou-se o módulo de membranas His-PEVA com tampão Hepes a 25 mM a pH 7,0, por todos os modos esquematizados na figura 3.3. Esgotou-se todo o tampão da concha e das mangueiras de silicone para que não houvesse diluição da solução contida no reservatório. Em um reservatório foi colocado 5 ml de plasma humano sadio e 5 ml de tampão de equilíbrio e acertou-se o pH dessa solução com gotas de HCl a 0,5 M para pH igual a 7,0. A concentração de IgG na alimentação da solução de plasma foi medida através de nefelometria (valor igual a 5 mg/ml) e essa solução foi alimentada através de uma bomba peristáltica (Digi-staltic Masterflex-bomba 1) no módulo, a uma vazão de alimentação (Q_I), em modo tangencial com recirculação do retentado e do filtrado.

A vazão de alimentação (Q_I) e a vazão do filtrado (Q_F) foram mantidas constantes usando 2 bombas peristálticas para fixar a razão Q_F/Q_I em 0,50, 0,68 e 0,86, conforme o experimento.

A recirculação da solução teve a duração de uma hora. A concentração de proteína total foi monitorada por um detector UV (Econo UV Bio-Rad) conforme mostrado na figura 3.7. Terminada a recirculação, fez-se a lavagem das fibras com tampão Hepes a 25 mm a pH 7,0 por todos os modos (figura 3.3). A regeneração do módulo foi feita com uma solução de NaOH a 1,5 M e sua lavagem empregando-se água Milli-Q conforme esquematizada na figura 3.3. Os experimentos foram feitos em duplicata.

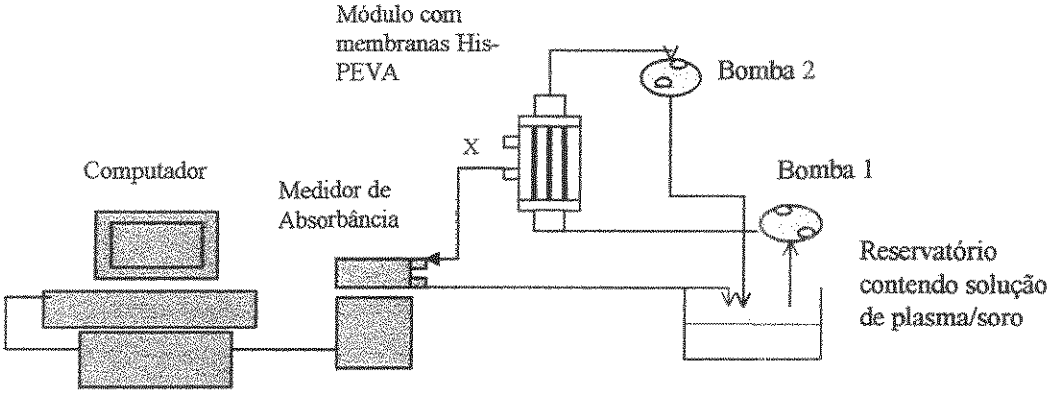


Fig. 3.7 - Esquema de montagem experimental dos experimentos com plasma humano sadio.

3.2.10. Experimentos de filtração com "pools" de soros de pacientes com doenças auto-imunes

Formação dos "pools" de soros de pacientes com doenças auto-imunes

Os "pools" de soros de pacientes foram formados de acordo com a disponibilidade do banco de soros do Laboratório de Imunologia Clínica da Unicamp e selecionados pelo tipo de auto-anticorpo. Para o auto-anticorpo anti-dsDNA fez-se dois "pools" (1 e 2), exemplificados na

tabela 3.5 e 3.6 respectivamente, o auto-anticorpo anti-SS-A/Ro ("pool" 3) está representado na tabela 3.7 e foram feitos "pools" (4 e 5) com vários auto-anticorpos presentes, exemplificados nas tabelas 3.8 e 3.9 respectivamente. Os valores dos auto-anticorpos de cada amostra sérica nas tabelas foram obtidos através de dosagens prévias realizadas no Laboratório de Imunologia Clínica.

Tabela 3.5 - "Pool" 1 de auto-anticorpos anti-dsDNA.

Amostras séricas	anti-dsDNA (IU/ml)	Volume da amostra (ml)
1	116,0	1,0
2	> 300,0*	1,0
3	86,0	1,0
4	35,1	1,0
5	127,0	1,0
6	121,2	1,0
7	68,0	1,0
8	263,0	1,0
9	32,0	1,5
10	122,2	1,5
11	297,5	1,0
12	45,5	0,5

* acima do limite de detecção do método.

Tabela 3.6 - "Pool" 2 de auto-anticorpos anti-dsDNA.

Amostras séricas	anti-dsDNA (IU/ml)	Volume da amostra (ml)
1	88,0	1,0
2	> 300,0*	1,0
3	107,0	1,0
4	65,0	1,0
5	84,2	1,0
6	> 300,0*	1,0
7	65,6	1,0
8	44,0	1,0
9	37,0	1,0
10	42,0	1,0
11	50,0	1,0
12	66,1	1,0
13	> 300,0*	1,0

* acima do limite de detecção do método.

Tabela 3.7 - "Pool" 3 de auto-anticorpos anti-SS-A/Ro.

Amostras séricas	anti-SS-A/Ro (IU/ml)	Volume da amostra (ml)
1	64,9	2,0
2	173,6	1,5
3	208,1	1,5
4	18,9	0,5
5	15,1	0,5
6	> 300*	0,5
7	80,8	1,0
8	13,8	1,0
9	11,9	1,0
10	52,5	1,0
11	71,9	1,0

* acima do limite de detecção do método.

Tabela 3.8 - "Pool" 4 de vários auto-anticorpos.

Amostras séricas	anti-dsDNA (IU/ml)	anti-SS-A/Ro (IU/ml)	anti-Sm/RNP (IU/ml)	anti-Sm (IU/ml)	anti-RNP (IU/ml)	Volume da amostra (ml)
1	79,1	12,6	215,0	__	215,0	1,0
2	34,8	183,2	76,9	__	76,9	1,5
3	__	71,9	28,6	16,7	11,9	1,0
4	__	46,7	100,1	__	100,1	1,0
5	__	123,7	56,7	__	56,7	1,0
6	72,1	__	27,4	__	27,4	1,0
7	36,8	__	18,9	__	18,9	1,0
8	51,7	__	48,6	__	48,6	1,0
9	> 300,0*	__	30,7	21,1	9,6	0,3
10	> 300,0*	241,7	88,1	10,7	77,4	1,2
11	48,0	__	112,2	__	112,2	1,0

__ ausência de auto-anticorpo; * acima do limite de detecção do método.

Tabela 3.9 - "Pool" 5 de vários auto-anticorpos.

Amostras séricas	anti-dsDNA (IU/ml)	anti-SS-A/Ro (IU/ml)	anti-Sm/RNP (IU/ml)	anti-Sm (IU/ml)	anti-RNP (IU/ml)	Volume da amostra (ml)
1	+	+	+	-	+	1,5
2	>300,0*	117,0	17,0	4,0	13,0	1,0
3	72,0	15,0	50,0	0,3	49,7	1,5
4	>300,0*	86,0	18,0	8,0	10,0	1,0
5	>300,0*	241,0	88,0	10,0	78,0	0,5
6	>300,0*	200,0				1,5
7		124,0	59,0	4,0	55,0	1,0
8		72,0	29,0	2,0	27,0	1,0
9	40,0	183,0	77,0	3,0	74,0	0,5
10	87,0	126,0				2,0
11	>300,0*	200,0				1,5

+ e - : amostras não testadas quantitativamente; __ ausência de auto-anticorpo; *acima do limite de detecção do método.

Experimentos de filtração utilizando-se "pools" de soros de pacientes com doenças auto-imunes

Os experimentos com "pool" de soros de pacientes com doenças auto-imunes foram realizados com o intuito de verificar a retenção e a adsorção dos auto-anticorpos em His-PEVA utilizando-se os seguintes tampões de equilíbrio: Hepes a 25 mM a pH 7,0 e Tris-HCl a 25 mM a pH 7,4.

Primeiramente, equilibrou-se o módulo de membranas de fibras ocas His-PEVA com o tampão de equilíbrio respectivo lavando-se conforme a figura 3.3. Esgotou-se todo o tampão da concha e das mangueiras de silicone para que não houvesse diluição da solução contida no reservatório onde colocou-se 5 ml de soro do "pool" e 5 ml de tampão de equilíbrio e acertou-se o pH dessa solução com gotas de HCl a 0,5 M para 7,0 para os experimentos com Hepes e para 7,4 nos experimentos com Tris-HCl. A solução sérica foi alimentada através de uma bomba peristáltica (Digi-staltic Masterflex-bomba 1) no módulo, a uma vazão de alimentação (Q_f), em

modo tangencial com recirculação do retentado e do filtrado conforme os experimentos com plasma humano sadio.

A vazão de alimentação (Q_I) e a vazão do filtrado (Q_F) foram mantidas constantes através de duas bombas peristálticas para fixar a razão Q_F/Q_I em 0,86.

A recirculação da solução teve a duração de uma hora. O experimento foi realizado conforme mostrado na figura 3.7. Após a recirculação, o módulo foi lavado com tampão de equilíbrio pelos modos esquematizados na figura 3.3 até que o cromatograma atingisse a linha-base. Acrescentou-se 0,4 M de NaCl ao tampão de equilíbrio e lavou-se em modo "backflushing" (figura 3.3) o módulo obtendo-se o volume de eluição. Terminado o experimento, fez-se a regeneração do módulo com uma solução de NaOH a 1,5 M. A lavagem do módulo com água Milli-Q foi realizada nos modos esquematizados na figura 3.3.

Foram medidas, através de teste ELISA para a detecção dos auto-anticorpos e através de nefelometria para a detecção de IgG, IgM, IgA e albumina, amostras referentes à solução sérica presente no reservatório antes e após 1 hora de recirculação e amostras referentes aos volumes de lavagem e eluição.

Cálculos realizados para a análise dos resultados obtidos através dos experimentos de filtração com amostras séricas contendo auto-anticorpos: Os valores referentes as unidades de auto-anticorpos retidas em His-PEVA (UR) ou massa de proteínas retidas em His-PEVA (MR) foram calculados através da equação:

$$z = \left[\left(\frac{PRE}{D}\right) - POS\right] \times V_r \qquad \text{Equação (3.4)}$$

onde:

z = UR (unidades de auto-anticorpos retidas em His-PEVA após 1 hora de recirculação em IU) ou MR (massa das proteínas: IgG, IgM, IgA e albumina retidas em His-PEVA após 1 hora de recirculação em mg);

D = diluição no interior das fibras (1,1);

Vr = volume total do reservatório (10 ml);

PRE = concentração de auto-anticorpo (IU/ml) ou proteína (mg/ml) alimentada;

POS = concentração de auto-anticorpo (IU/ml) ou proteína (mg/ml) após 1 hora de recirculação;

A porcentagem removida (%R) e a porcentagem adsorvida (%A) foram calculadas de acordo com as equações 3.5 e 3.6 respectivamente:

$$\%R = \frac{z}{\left[\left(\frac{PRE}{D}\right) \times Vr\right]} \times 100 \qquad \text{Equação (3.5)}$$

$$\%A = \frac{E}{\left[\left(\frac{PRE}{D}\right) \times Vr\right]} \times 100 \qquad \text{Equação (3.6)}$$

onde:

%R = porcentagem de auto-anticorpo ou proteína removida;

%A = pocentagem de auto-anticorpo ou proteína adsorvida;

z = UR (unidades de auto-anticorpos retidas em His-PEVA após 1 hora de recirculação (IU), calculada em 3.4) ou MR (massa das proteínas: IgG, IgM, IgA e albumina retidas em His-PEVA após 1 hora de recirculação (mg), calculada na equação 3.4);

E = quantidade de auto-anticorpo (IU) ou proteína (mg) eluída;

D = diluição no interior das fibras (1,1);

Vr = volume total do reservatório (10 ml);

PRE = concentração de auto-anticorpo (IU/ml) ou proteína (mg/ml) alimentada;

As capacidades de adsorção (Ca) e de retenção (Cr) em His-PEVA foram calculadas conforme as equações 3.7 e 3.8 respectivamente:

$$Ca = \frac{E}{A}$$ Equação (3.7)

$$Cr = \frac{z}{A}$$ Equação (3.8)

onde:

Ca = capacidade de adsorção de auto-anticorpo (IU/cm^2) ou proteína (mg/cm^2) em His-PEVA;

Cr = capacidade de retenção de auto-anticorpo (IU/cm^2) ou proteína (mg/cm^2) em His-PEVA;

E = unidades de auto-anticorpo (IU) ou massa de proteína (mg) presente na eluição;

z = UR (unidades de auto-anticorpo retidas em His-PEVA após 1 hora de recirculação (IU), calculada na equação 3.4) ou MR (massa de proteínas: IgG, IgM, IgA e albumina retidas em His-PEVA após 1 hora de recirculação (mg), calculada na equação 3.4);

A = área superficial interna das membranas, calculada na equação 3.1 (50,3 cm^2);

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ADSORÇÃO DE IgG EM FIBRAS OCAS DE PVA COM HISTIDINA IMOBILIZADA

As membranas de fibras ocas de PVA foram escolhidas como suporte para a imobilização de histidina por apresentarem um diâmetro de poro de 0,2 μm, bem maiores que os poros da membrana PEVA (≅ 0,05 μm), com o objetivo de minimizar o acúmulo de proteínas retidas nas vizinhanças e no interior dos poros, fenômenos observados em His-PEVA e que interferem no desempenho da membrana em adsorver IgG (BUENO et al., 1995b).

4.1.1. Ativação da membrana de PVA e imobilização de histidina

As membranas foram retiradas de um cartucho comercial e foram finamente cortadas em comprimentos de aproximadamente 2 a 5 mm. Em seguida, foram submetidas a ativação e imobilização do ligante.

A ativação das membranas foi realizada por BUENO (1995), com 1,4 butanodiol diglicidil éter, devido ao fato da membrana de PVA apresentar grupamentos hidroxilas que permitem serem ativados por reagentes que apresentem grupamentos epóxido. Uma vez que 1,4 butanodiol diglicidil éter é um agente bifuncional, histidina pode ser imobilizada no suporte, sendo que a reação de acoplamento ocorreu entre o grupamento epóxido e o grupo α-amino do aminoácido. A membrana de afinidade foi denominada His-PVA e a sua estrutura proposta está apresentada na figura 4.1.

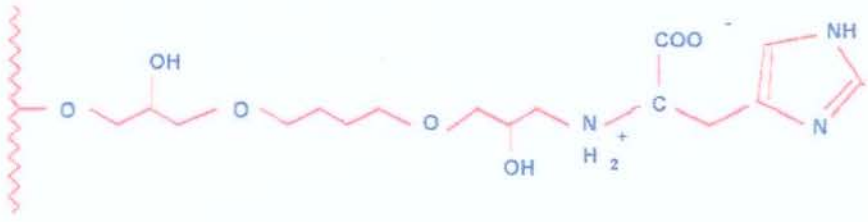


Fig. 4.1- Estrutura proposta da membrana de fibra oca de álcool poli vinílico com histidina imobilizada, após ativação com 1,4 butanodiol diglicidil éter (HAUPT et al., 1995).

4.1.2. Experimentos cromatográficos com membranas His-PVA

O objetivo principal desses ensaios foi verificar a adsorção de IgG humana pura em membranas His-PVA. Através dos resultados obtidos por HAUPT et al. (1995), onde se testou para as membranas His-PEVA várias soluções tamponantes em diversas faixas de pH, foi observado que as melhores condições de adsorção de IgG foram obtidas com os tampões Hepes a 25 mM a pH 7,0 e Mops a 25 mM a pH 6,5. Devido a esse fato, para os testes cromatográficos com IgG humana pura em membranas His-PVA, foram utilizados os tampões acima citados. A eluição foi realizada com tampão acetato de sódio a 25 mM contendo 1 M de NaCl a pH 4,0 e a regeneração com solução de NaOH a 25 mM conforme descrito em materiais e métodos.

As figuras 4.2 e 4.3 ilustram os cromatogramas típicos dos experimentos realizados com tampão Hepes e tampão Mops, respectivamente. O primeiro grande pico representa a lavagem, ou seja, as proteínas não adsorvidas em His-PVA, o segundo pico, a IgG eluída. A cromatografia foi finalizada através de uma lavagem das fibras com uma solução de NaOH a 25 mM (terceiro pico). A tabela 4.1 mostra os resultados dos experimentos

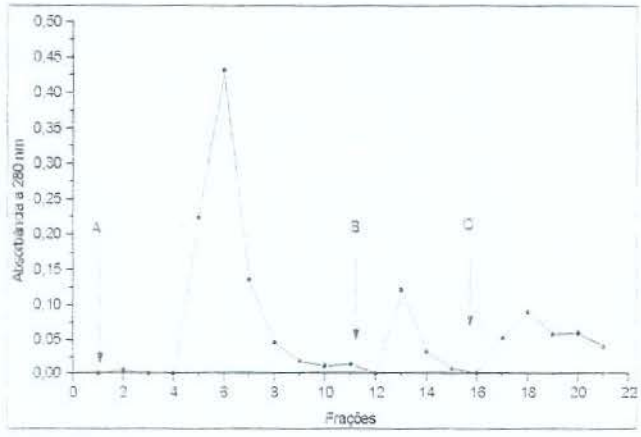


Fig. 4.2 - Cromatograma com IgG pura em membranas de fibras ocas de His-PVA em tampão Hepes a 25 mM a pH 7,0. Injeção de 2 mg de IgG diluída em 2 ml de tampão de equilíbrio (A). Eluição: tampão acetato de sódio a 25 mM contendo 1 M de NaCl a pH 4,0 (B). Regeneração: solução de NaOH a 25 mM (C). Volume de leito de 1 ml. Vazão de alimentação de 0,4 ml/min. Volume das frações de 2,4 ml.

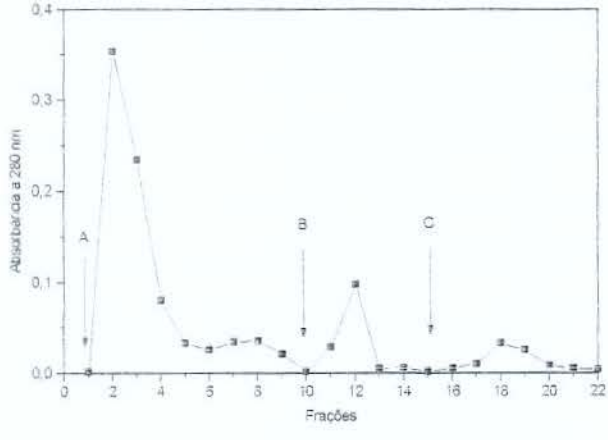


Fig. 4.3 - Cromatograma com IgG pura em membranas de fibras ocas His-PVA em tampão Mops a 25 mM a pH 6,5. Injeção de 2 mg de IgG diluída em 2 ml de tampão de equilíbrio (A). Eluição: tampão acetato de sódio a 25 mM contendo 1 M de NaCl a pH 4,0 (B). Regeneração: solução de NaOH a 25 mM (C). Volume de leito de 1 ml. Vazão de alimentação de 0,4 ml/min. Volume das frações de 2,4 ml.

Tabela 4.1 - Balanço de massa referente aos experimentos com IgG pura em His-PVA utilizando-se o tampão de equilíbrio Hepes a 25 mM a pH 7,0 e Mops a 25 mM a pH 6,5.

Tampão	ensaios	Quantidade de IgG (mg)		Quantidade de IgG presente em cada etapa (mg)		
		injetada	recuperada	lavagem	eluição	regeneração
Hepes	1	2,00	2,05	1,36	0,21	0,48
	2	2,00	1,98	1,31	0,24	0,43
Mops	1	2,00	2,02	1,45	0,25	0,32
	2	2,00	2,00	1,53	0,30	0,17

Os resultados obtidos nos ensaios com tampão Hepes e Mops visualizados na tabela 4.1 apresentam reprodutibilidade, uma vez que as quantidades de IgG obtidas nas etapas de eluição e lavagem são similares. O alto valor mássico de IgG obtido na fração de lavagem pode ser atribuído ao excesso de proteína injetada em relação à capacidade máxima da coluna. A quantidade de IgG referente à eluição é menor que 15% do total de proteína injetada nos experimentos com Hepes e Mops. Observa-se que a quantidade de IgG fortemente retida em His-PVA nos experimentos com tampão Hepes é em média 10% maior que em presença de Mops. Embora os ensaios com tampão Mops e tampão Hepes tenham apresentado resultados similares referentes à adsorção de IgG humana pura, representada pela quantidade de IgG presente na eluição, utilizou-se o tampão Hepes a 25 mM a pH 7,0 para a realização dos experimentos com o plasma humano pois o seu pH (7,0) é mais próximo do pH do plasma (7,3).

Adsorção de IgG a partir do plasma humano sadio em His-PVA

Esse experimento foi realizado com o objetivo de testar a seletividade em relação à adsorção de IgG em His-PVA frente a grande quantidade de proteínas encontradas no plasma. O procedimento foi basicamente o mesmo dos experimentos anteriores, apenas com a mudança de algumas condições experimentais de acordo com o descrito em materiais e métodos.

Foi injetado na coluna contendo membranas His-PVA, 500 µl de plasma humano diluído em 2 ml de tampão Hepes a 25 mM a pH 7,0. BUENO et al. (1996) demonstraram que se soro ou plasma não forem previamente diluídos antes de serem alimentados nas membranas de álcool poli

etileno vinílico contendo histidina imobilizada, His-PEVA, a quantidade de proteínas adsorvidas é cerca de 50 % menor de quando é feita uma diluição prévia do soro ou plasma no tampão de equilíbrio. As frações referentes às etapas de lavagem e eluição foram respectivamente agrupadas e analisadas através de uma eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras, cujo o resultado está apresentado na figura 4.4. A quantidade de proteína total na eluição foi de 0,9 mg e a quantidade de proteínas no plasma injetado igual a 21 mg.

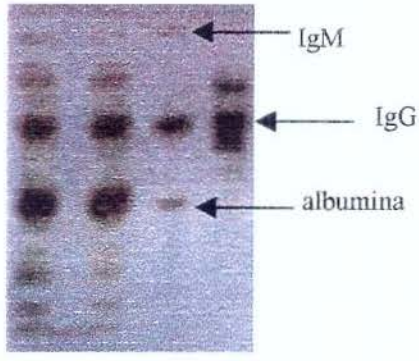


Fig. 4.4 - Eletroforese SDS-PAGE em condições não redutoras com gel de acrilamida, gradiente 4-15%, referente as frações obtidas na cromatografia com plasma humano sadio em His-PVA utilizando-se o tampão de equilíbrio Hepes a 25 mM a pH 7,0. Faixas: 1 - plasma total; 2 – frações de lavagem (pico 1); 3 – frações de eluição (pico 2); 4 - IgG pura (Sigma).

Nessa eletroforese, as frações de lavagem, representadas na faixa 2, contém as proteínas não retidas em His-PVA, tais como, albumina, imunoglobulinas e outras proteínas do plasma humano. Na faixa 3 visualiza-se as bandas de IgG, albumina e de uma proteína de alta massa molecular que provavelmente corresponde a IgM. O grau de pureza da IgG utilizada neste trabalho (Sigma) é igual a 99% e a visualização de outras bandas na faixa 4 podem ser causadas pela presença de 1% de contaminante na amostra, pois na coloração do gel utilizou-se nitrato de prata, podendo-se detectar a presença de proteínas em baixas concentrações.

Com base nos resultados obtidos as membranas de fibras ocas His-PVA apresentam-se, talvez, como uma alternativa aos suportes existentes para a separação ou remoção de IgG a partir do plasma humano.

4.2. ADSORÇÃO DE ANTICORPOS EM MEMBRANAS DE FIBRAS OCAS DE PEVA COM HISTIDINA IMOBILIZADA

Após algum tempo de utilização das membranas de PVA como suporte para imobilização de histidina, tomou-se ciência que essas membranas, comumente utilizadas em plasmaferese, não estavam sendo mais fabricadas, não se encontrando à venda no mercado devido a comercialização de outras membranas que apresentam melhores resultados para a aplicação em plasmaferese. As membranas utilizadas atualmente em plasmaferese são de nylon, polimetacrilato, polipropileno ou polietileno, sendo estes materiais de mais difícil ativação que o PVA para posterior imobilização do ligante.

Decidiu-se utilizar as membranas de fibras ocas de álcool poli etileno vinílico, PEVA, como suporte para a imobilização de histidina, pois BUENO et al. (1995a, 1995b e 1996) demonstraram a eficácia da membrana de afinidade His-PEVA em adsorver IgG do plasma humano. Membranas de PEVA são biocompatíveis, utilizadas na filtração do plasma para remoção de proteínas patogênicas apresentando, no entanto, tamanho de poros menor que os da membrana de PVA. Devido ao fato desses poros apresentarem pequeno diâmetro, durante a filtração do plasma em His-PEVA, BUENO et al. (1996) observaram a formação de uma camada de polarização de concentração e acúmulo de proteínas retidas nas vizinhanças e no interior dos poros da membrana. Para trabalhar com esse suporte seria necessário alterar as condições operacionais para evitar, ao menos, o acúmulo de proteínas que durante a filtração ficam retidas nas vizinhanças e no interior dos poros da membrana.

4.2.1. Adsorção de IgG humana pura em His-PEVA

Após a ativação e a imobilização de histidina nas membranas de PEVA, conforme descrito em materiais e métodos, realizou-se experimentos cromatográficos utilizando-se os tampões de

equilíbrio Hepes e Mops, a fim de verificar a eficácia de His-PEVA em adsorver IgG humana pura. De acordo com o descrito em HAUPT et al. (1995), os tampões de equilíbrio que possibilitam maior adsorção de IgG na membrana de PEVA são Hepes a 25 mM a pH 7,0 e Mops a 25 mM a pH 6,5. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 4.2, onde se observa que a quantidade de IgG presente na eluição em ambos experimentos corresponde à 38% do total de IgG injetada.

Tabela 4.2 – Balanço de massa referente as cromatografias de IgG pura em membranas His-PEVA utilizando-se os tampões de equilíbrio Hepes a 25 mM a pH 7,0 e Mops a 25 mM a pH 6,5.

Tampão	Quantidade de IgG (mg)		Quantidade de IgG presente nas etapas (mg)		
	injetada	recuperada	lavagem	eluição*	regeneração*
Hepes	2,17	2,14	0,94	0,83	0,37
Mops	1,90	1,83	0,71	0,74	0,38

* eluição: tampão acetato de sódio a 25 mM contendo 1 M de NaCl a pH 4,0; regeneração: solução de NaOH a 25 mM;

Comparando-se os valores da tabela 4.3, referentes à quantidade de IgG adsorvida por volume de leito utilizado (T), os resultados obtidos com membranas His-PVA diferem em 18% para Hepes e em 12% para Mops em relação aos resultados obtidos com His-PEVA. Esses valores foram determinados através do valor médio da quantidade de IgG obtida na eluição (tabela 4.1) dividido pelo volume de leito utilizado nos experimentos e para His-PEVA, foram determinados através do valor da quantidade de IgG na eluição referente a cada tampão (tabela 4.2) dividido pelo volume de leito.

Tabela 4.3 - Comparação das quantidades de IgG adsorvida por volume de leito utilizado para His-PVA e His-PEVA.

	Membranas His-PVA		Membranas His-PEVA	
	Hepes	Mops	Hepes	Mops
T* (mg/ml)	0,23	0,28	0,28	0,25
Vl* (ml)	1	1	3	3

*T = quantidade de IgG adsorvida (presente na eluição) por volume de leito utilizado;
Vl = volume de leito das membranas utilizado nos experimentos.

Através de experimentos realizados no laboratório filtrando-se por várias vezes consecutivas o plasma humano diluído em tampão, observou-se que o tampão Mops a 25 mM a pH 6,5 promovia uma precipitação de proteínas, provocando entupimentos nos poros da membrana His-PEVA, fato não ocorrido ao utilizar-se Hepes a 25 mM a pH 7,0, além desse tampão apresentar um pH próximo ao do plasma. Dessa forma, escolheu-se o tampão Hepes para os ensaios com amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes por possuir um pH próximo ao pH do sangue e não promover a precipitação de proteínas, como observado com o tampão Mops.

Definida a membrana His-PEVA como matriz para a imobilização do ligante e o tampão no qual o plasma ou soro seria diluído, a próxima etapa do trabalho consistiu em avaliar a adsorção de auto-anticorpos em His-PEVA.

4.2.2. Adsorção de auto-anticorpos em His-PEVA

Uma vez que DARNIGE et al. (1999) constataram que anticorpos anti-fosfolipídios presentes em pacientes com sídrome anti-fosfolípidio foram retidos em His-PEVA, nesse trabalho decidiu-se verificar se outros auto-anticorpos típicos de doenças auto-imunes seriam adsorvidos nesta membrana. Foram selecionadas, segundo a disponibilidade do banco de soros do Laboratório de Imunologia Clínica, amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes que apresentavam uma quantidade significativa de auto-anticorpos (quantidade maior que o valor mínimo positivo detectado pelo teste ELISA), as quais estão representadas na tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes selecionadas para o estudo.

Amostras Séricas	Tipos de auto-anticorpos	Quantidade de auto-anticorpos (IU/ml)			
		anti-dsDNA	anti-SS-A/Ro	anti-Sm	anti-Sm/RNP
1	anti-dsDNA	169,60	-	-	-
2	Anti-SS-A/Ro, anti-Sm, anti-dsDNA e anti-Sm/RNP	>300,00*	85,69	9,12	17,86
3	Anti-SS-A/Ro, anti-dsDNA e anti-Sm/RNP	>300,00*	117,10	-	16,98

* acima da faixa de detecção do teste ELISA; - : ausência de auto-anticorpo.

A amostra 1 apresentava uma grande quantidade de auto-anticorpos do tipo anti-dsDNA, as amostras 2 e 3 apresentavam uma maior variedade de auto-anticorpos, além do anti-dsDNA, também típicos da doença auto-imune lupus eritematoso sistêmico (L.E.S.).

Os experimentos com amostras séricas foram realizados utilizando-se uma coluna com membranas His-PEVA finamente cortadas. Como a quantidade de soro disponível de cada paciente no banco de soros era pequena utilizou-se apenas 500 µl de soro em cada experimento. Fez-se a lavagem da coluna com tampão Hepes a 25 mM a pH 7,0, a eluição adicionando-se 1 M de NaCl ao tampão de equilíbrio, seguida de regeneração com solução de NaOH a 25 mM e lavagem com água ultrapura, conforme representado na figura 4.5.

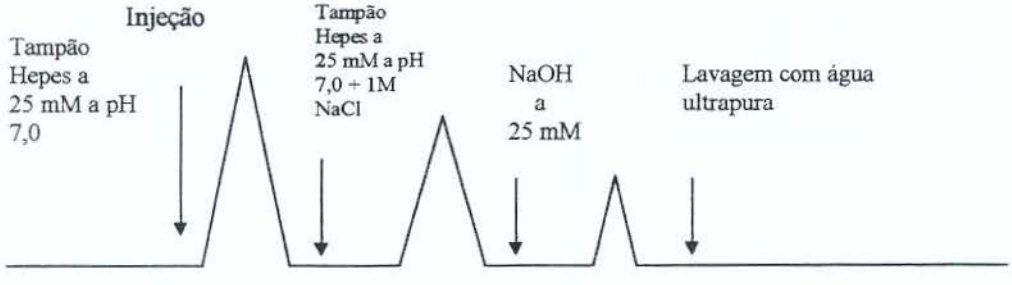


Fig. 4.5 - Esquema do cromatograma típico dos experimentos com amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes em membranas His-PEVA utilizando-se como tampão de equilíbrio Hepes a 25 mM a pH 7,0.

As frações eluídas foram testadas em kits Kallestad Microplate EIA (EUA) através do teste ELISA, cujo os resultados estão representados na tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Quantidades de auto-anticorpos presentes nas frações de eluição e comparação com o valor mínimo positivo estabelecido pelo teste.

Amostras Séricas	Teste ELISA (IU/ml)		Positivo a partir de (IU/ml)
1	anti-dsDNA	76,40	30,00
2	anti-Sm/RNP	80,00	8,00
	Anti-Sm	30,00	8,00
	anti-SS-A/Ro	63,00	8,00
3	anti-SS-A/Ro	15,70	8,00

Observa-se pelos resultados apresentados na tabela 4.5 que houve adsorção dos auto-anticorpos testados, pois as medidas referentes às frações de eluição apresentaram resultados positivos. Devido à grande diluição das amostras nos volumes de lavagem e eluição, houve dificuldade de medição dessas frações através do teste ELISA, tendo-se a necessidade de adicionar um volume maior da amostra do que o indicado pelo protocolo do referido teste (10 μl), fato que pode ter provocado discrepâncias nos resultados.

Tentou-se, em vão, concentrar as frações de lavagem e eluição através de ultrafiltração. Devido a grande perda de proteínas, que ficaram retidas nas paredes do recipiente e na membrana, o fechamento do balanço de massa tornou-se ainda mais difícil.

Como houve dificuldade de análise das frações de lavagem e de eluição dos experimentos em membranas His-PEVA finamente cortadas, decidiu-se utilizar um módulo de filtração e realizar experimentos com maior quantidade de soro, através da formação de um "pool" de amostras séricas de vários pacientes com doenças auto-imunes. Com o intuito de evitar a utilização de grandes volumes de proteína, construiu-se um pequeno módulo de filtração contendo membranas de fibras ocas de PEVA e imobilizou-se histidina. Os experimentos foram realizados com os

"pools", simulando-se um tratamento extracorpóreo *in vitro*, conforme apresentado no tópico seguinte.

4.3. REMOÇÃO *IN VITRO* DE AUTO-ANTICORPOS EM MÓDULO DE FILTRAÇÃO HIS-PEVA

As membranas de fibras ocas de PEVA foram retiradas de um cartucho comercial e fixadas em um módulo de vidro. A ativação das membranas foi realizada com 1,4 butanodiol diglicidil éter e histidina foi imobilizada conforme descrito em materiais e métodos.

4.3.1. Verificação da imobilização de histidina nas membranas por sulfato de cobre

Através de uma análise qualitativa, a solução de sulfato de cobre a 50 mM foi alimentada no módulo de membranas His-PEVA em modo frontal, que se tornou levemente azul (semelhante a coloração da solução de sulfato de cobre) devido as ligações de coordenação do cobre com a histidina. Em seguida, lavou-se as membranas com água ultrapura para eliminar o excesso de cobre que não formou ligações de coordenação com a histidina imobilizada. Verificou-se que a coloração azul persistiu nas membranas após a lavagem das mesmas mostrando, assim, que a histidina estava imobilizada nas fibras.

4.3.2. Retenção de IgG humana pura em His-PEVA

Tendo-se imobilizado o aminoácido histidina nas membranas, em seguida, avaliou-se a influência da razão Q_F/Q_I (vazão do filtrado/vazão de alimentação) e da concentração inicial de IgG na alimentação na capacidade de retenção das membranas His-PEVA. Esse estudo foi realizado com o objetivo de determinar as melhores condições a serem utilizadas nos experimentos com amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes.

Os experimentos de filtração foram realizados de acordo com um planejamento experimental (BARROS NETO et al., 1995), tomando-se como variáveis independentes a concentração de IgG na alimentação e a razão Q_F/Q_I, e tendo-se como variável dependente a capacidade de retenção de IgG do suporte.

Para averiguação do efeito dessas duas variáveis na capacidade de retenção utilizou-se a faixa de concentração de IgG na alimentação de 2,5 a 7,5 mg/ml, baseando-se na concentração de IgG no plasma de um indivíduo sadio, cuja a concentração máxima é de 15 mg/ml (HOFFMAN, 1970) e na necessidade de diluição da proteína no tampão de adsorção (1:1). Para a razão Q_F/Q_I, utilizou-se a faixa entre 0,50 e 0,86. O limite máximo de 0,86 foi escolhido de acordo com trabalhos publicados nos quais os autores empregam o valor de 0,86 para Q_F/Q_I na circulação extracorpórea do plasma através de filtração em cascata (LEGALLAIS et al., 1994). No entanto, nessa condição tem-se freqüentemente observado o fenômeno de colmatagem quando membranas com pequeno diâmetro de poros são utilizadas, como é o caso da membrana de PEVA. Assim, o valor do limite inferior de 0,50 foi escolhido com a intenção de evitar a colmatagem da membrana durante a filtração do plasma. Os resultados para a capacidade de retenção do suporte, segundo o planejamento experimental utilizado, são apresentados na tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Resultados do planejamento experimental linear 2^2 realizado com IgG humana pura para avaliar a retenção de IgG em His-PEVA através de variações na concentração de IgG na alimentação e na razão Q_F/Q_I.

Ensaio	Razão Q_F/Q_I	CA * (mg/ml)	CAD* (mg/ml)	CF* (mg/ml)	CR* (mg/cm^2)
1	0,5 (-)	2,5 (-)	2,27	1,32	0,189
2	0,86(+)	2,5(-)	2,30	1,33	0,193
3	0,5 (-)	7,5(+)	6,82	4,23	0,515
4	0,86(+)	7,5(+)	6,80	3,60	0,636
5	0,68(0)	5,0 (0)	4,62	2,48	0,425
6	0,68(0)	5,0 (0)	4,60	2,35	0,447
7	0,68(0)	5,0 (0)	4,55	2,5	0,408

*CA: concentração de IgG na alimentação; CAD: concentração de IgG na alimentação após sua diluição no interior das membranas; CF: concentração final de IgG no reservatório após 1 hora de recirculação e CR: capacidade de retenção de IgG das membranas His-PEVA.

O estudo do efeito da concentração de IgG na alimentação e da variação da razão Q_F/Q_I na capacidade de retenção de IgG do suporte resultou na superfície de resposta representada na figura 4.6, na qual o modelo linear ajustou-se bem aos dados, tendo-se obtido R^2 próximo de 1. A tabela 4.7 apresenta os valores da análise de variância (teste F) e R^2 obtidos no estudo onde o valor de R_c é 33,56 sendo maior que R (9,28) no nível de confiança de 95%, indicando uma regressão significativa. A confirmação do bom ajuste do modelo em relação aos dados ocorre na análise da falta de ajuste e erro puro, P_c é 11,20 sendo menor que P (18,51), indicando que o erro e a falta de ajuste são desprezíveis.

Tabela 4.7 - Análise de regressão e variância do planejamento experimental linear 2^2 realizado para verificar a influência das variáveis concentração de IgG na alimentação e razão Q_F/Q_I na capacidade de retenção de IgG em His-PEVA.

Estudo	Modelo	R^2	F tabelado		F calculado	
			R*	P*	R_c*	P_c*
Retenção	Linear	0,97	9,28	18,51	33,56	11,20

* R: valor de F tabelado para a análise de regressão (intervalo de confiança de 95%);
P: valor de F tabelado para a falta de ajuste e erro puro (intervalo de confiança de 95%);
R_c: valor de F calculado para a análise de regressão;
P_c: valor de F calculado para a falta de ajuste e erro puro.

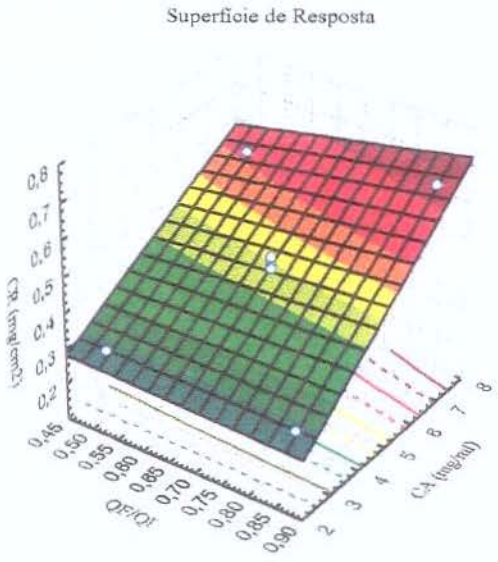


Fig. 4.6 - Superfície de resposta do planejamento experimental linear 2^2 realizado para estudar os efeitos das variáveis concentração de IgG na alimentação e razão Q_F/Q_I na capacidade de retenção de IgG em His-PEVA.

Da análise da superfície de resposta obtida, verifica-se que a retenção de IgG é praticamente indiferente em relação a variação de Q_F/Q_I. Apesar dos resultados de capacidade de retenção dos experimentos realizados com Q_F/Q_I igual a 0,86 serem maiores que os resultados encontrados nos experimentos onde se utilizou Q_F/Q_I igual a 0,5, referentes à concentração de IgG na alimentação igual a 7,5 mg/ml, tem-se que essa diferença através do modelo é irrelevante estatisticamente. A inclinação do gráfico referente ao eixo relacionado à Q_F/Q_I é muito pequena. A concentração de IgG na alimentação exerce um efeito relevante na capacidade de retenção do suporte, podendo ser observado através da característica crescente da superfície de resposta. Com o aumento da concentração obtém-se um aumento na capacidade de retenção, dentro da faixa escolhida para o estudo. Observa-se, ainda, que as concentrações utilizadas não foram suficientes para saturar as membranas His-PEVA.

Com base nesses resultados, decidiu-se verificar a influência de Q_F/Q_I empregando-se concentrações de IgG na alimentação em uma faixa que poderia abranger também os pacientes com doenças auto-imunes, que podem atingir níveis de concentração de IgG no soro muito

maiores que os níveis de IgG encontrados em indivíduos sadios, tentando-se obter também a saturação de IgG nas membranas objetivando-se uma otimização.

Estudou-se a faixa de concentração de alimentação de IgG de 7,5 a 25 mg/ml, pois a análise dos valores abaixo de 7,5 mg/ml foi realizada no planejamento anterior e seria muito difícil encontrar pacientes com doenças auto-imunes com os níveis de IgG acima do valor estipulado de 25 mg/ml (como os experimentos são realizados com diluição da proteína no tampão de equilíbrio 1:1, seria correspondente a um paciente com nível de IgG equivalente a 50 mg/ml). Os resultados obtidos nesse planejamento estão na tabela 4.8.

A superfície de resposta obtida nesse segundo planejamento está apresentada na figura 4.7 e a análise de variância e a regressão obtidas através do planejamento experimental linear 2^2 estão apresentadas na tabela 4.9.

Tabela 4.8 - Avaliação dos resultados obtidos do planejamento experimental linear 2^2 efetuado para estudar os efeitos da concentração de IgG na alimentação e da razão Q_F/Q_I na retenção de IgG em His-PEVA.

Ensaio	Relação Q_F/Q_I	CA* (mg/ml)	CAD* (mg/ml)	CF* (mg/ml)	CR* (mg/cm^2)
1	0,5(-)	7,5(-)	6,82	4,23	0,515
2	0,86(+)	7,5(-)	6,8	3,6	0,636
3	0,5(-)	25(+)	22,77	13,67	1,809
4	0,86(+)	25(+)	23,26	12,82	2,076
5	0,68(0)	16,25(0)	14,78	9,1	1,129
6	0,68(0)	16,25(0)	14,99	9	1,191
7	0,68(0)	16,25(0)	14,83	8,33	1,292

*CA: concentração de IgG na alimentação; CAD: concentração de IgG na alimentação após sua diluição no interior das membranas; CF: concentração final de IgG no reservatório após 1 h de recirculação e CR: capacidade de retenção de IgG das membranas His-PEVA;

Tabela 4.9 - Análise de regressão e variância do planejamento experimental linear 2^2 realizado para verificar a influência das variáveis concentração de IgG na alimentação e razão Q_F/Q_I na capacidade de retenção de IgG em His-PEVA.

Estudo	Modelo	R^2	F tabelado		F calculado	
			R*	P*	R_c*	P_c*
Retenção	Linear	0,99	9,28	18,51	103,18	0,98

* R: valor de F tabelado para a análise de regressão (intervalo de confiança de 95%);
P: valor de F tabelado para a falta de ajuste e erro puro (intervalo de confiança de 95%);
R_c: valor de F calculado para a análise de regressão;
P_c: valor de F calculado para a falta de ajuste e erro puro;

Da tabela 4.9, o R^2 igual a 0,99 demonstra um bom ajuste linear dos dados. Pela análise de variância dos dados, o R_c igual a 103,18 é bem maior que o R tabelado igual a 9,28, mostrando que a regressão é significativa. O P_c é 0,98 e encontra-se muito menor que o P tabelado no intervalo de confiança de 95% (18,51); portanto, pode-se dizer que a falta de ajuste e o erro obtidos no planejamento são praticamente insignificantes, fato que confirma o bom ajuste do modelo linear.

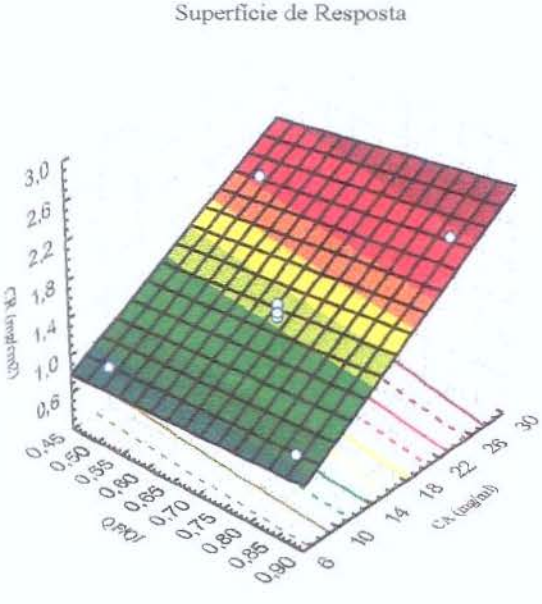


Fig. 4.7 - Superfície de resposta do planejamento experimental linear 2^2 realizado para estudar os efeitos das variáveis concentração de IgG na alimentação e razão Q_F/Q_I na capacidade de retenção de IgG em His-PEVA.

A superfície de resposta obtida na figura 4.7 mostrou um resultado similar àqueles do planejamento anterior, onde a influência da variável Q_F/Q_I não tem um efeito relevante no processo de retenção de IgG. Com o aumento da concentração de IgG na alimentação há um aumento na capacidade de retenção de IgG em His-PEVA pois, provavelmente, a saturação da membrana não foi atingida.

É importante ressaltar que na retenção de IgG em His-PEVA, há vários fenômenos que podem estar ocorrendo, provocando a remoção da proteína, como a formação de uma camada de polarização e o acúmulo de proteínas nas vizinhanças e no interior dos poros da membrana, podendo não significar uma interação da proteína com o ligante imobilizado.

A superfície de resposta (figura 4.7) apresenta um comportamento crescente, mostrando que, como a saturação de IgG em His-PEVA não foi atingida, haveria a possibilidade de realizar experimentos em uma faixa de concentração de IgG na alimentação acima dos valores utilizados. No entanto, raramente pacientes com doenças auto-imunes apresentam nível de concentração de IgG superiores aos estudados sendo, dessa forma, desnecessário aumentar as faixas de concentração de IgG na alimentação.

Como todos os experimentos para determinar o efeito das variáveis estudadas no processo de remoção de IgG foram realizados com proteína pura, houve a necessidade de avaliar a ia de Q_F/Q_I na capacidade de retenção da membrana empregando-se plasma. O intuito desses experimentos foi verificar se a presença de outras proteínas presentes no plasma, diferentes e IgG, influenciariam na capacidade de retenção desta proteína em His-PEVA.

4.3.3. Influência de Q_F/Q_I na filtração do plasma em His-PEVA

Com o objetivo de verificar a influência de Q_F/Q_I na retenção de IgG frente as demais proteínas presentes no plasma, variou-se Q_F/Q_I de 0,50 a 0,86 para uma mesma concentração de IgG do plasma sadio de 10 mg/ml, que diluído em uma razão de 1:1 correspondeu a 5 mg/ml.

O procedimento foi o mesmo utilizado nos experimentos com IgG humana pura. Mediu-se a concentração final de IgG do reservatório após 1 hora de recirculação em cada ensaio realizado

através de nefelometria. Para cada valor de Q_F/Q_I foi feita uma duplicata. A tabela 4.10 apresenta os valores médios obtidos.

Tabela 4.10 - Análise da influência de Q_F/Q_I na retenção de IgG de plasma humano sadio em His-PEVA.

Q_F/Q_I	Capacidade de retenção de IgG (mg/cm^2)
0,50	0,465
0,68	0,460
0,86	0,470

* volume do reservatório: 10 ml.

Analisando-se os resultados obtidos na tabela 4.10, há confirmação do resultado obtido com IgG humana pura, onde a variação de Q_F/Q_I não demonstrou relevância no processo. Os valores de capacidade de retenção para cada experimento foram muito próximos. Portanto, para os experimentos com "pool" de soros de pacientes com doenças auto-imunes poderia-se utilizar qualquer valor de Q_F/Q_I desejado.

4.3.4. Retenção e Adsorção de auto-anticorpos em His-PEVA

Visto que a variável independente Q_F/Q_I não influencia na capacidade de retenção de IgG, para avaliar a adsorção de auto-anticorpos na membrana de afinidade, utilizou-se Q_F/Q_I igual a 0,86 por ser um valor tradicionalmente utilizado em circulação extracorpórea para a remoção de proteínas "patogênicas" do plasma humano (LEGALLAIS et al., 1994).

Para a realização desse estudo, selecionou-se amostras séricas de pacientes que apresentavam auto-anticorpos típicos do LE.S., formando-se cinco "pools". Os "pools" foram formados conforme a disponibilidade do volume das amostras no banco de soros e esses "pools" diferiram entre si na quantidade e tipos de auto-anticorpos. Primeiramente, decidiu-se estudar os

auto-anticorpos anti-dsDNA e anti-SS-A/Ro separadamente e, por último, esses auto-anticorpos em presença de outros auto-anticorpos. Os outros auto-anticorpos anti-Sm, anti-RNP e anti-Sm/RNP não foram testados separadamente devido à dificuldade de se encontrar uma quantidade suficiente de amostras para a formação desses "pools". Após a elaboração do "pool" foi feita uma nova medida para cada auto-anticorpo, onde se obteve o resultado total representado na tabela 4.11. Todas as medidas de quantificação de auto-anticorpos foram feitas através de ELISA.

Os valores totais referentes ao anti-RNP foram calculados pela diferença entre os valores totais de anti-Sm/RNP e anti-Sm, pois não dispomos de kits ELISA para a detecção desses auto-anticorpos. O valor do auto-anticorpo anti-cardiolipina foi medido apenas para o "pool" total não dispondo-se dos dados de cada paciente.

Tabela 4.11 - Quantidades de auto-anticorpos presentes nos "pools" de amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes obtidas através de teste ELISA.

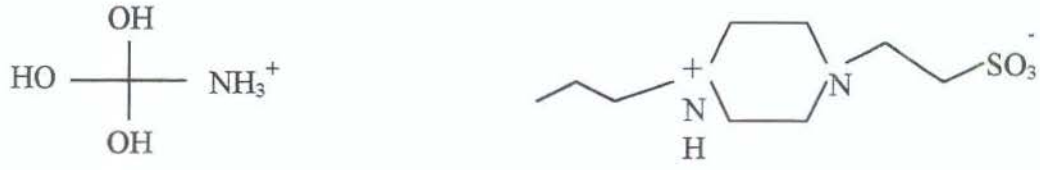
"Pools"	anti-dsDNA (IU/ml)	anti-SS-A/Ro (IU/ml)	anti-Sm/RNP (IU/ml)	anti-Sm (IU/ml)	Anti-RNP (IU/ml)	anti-cardiolipina (IU/ml)	Volume (ml)
1	130,60	__	__	__	__	__	12,50
2	405,60	__	__	__	__	__	13,00
3	__	145,20	__	__	__	__	11,50
4	105,20	99,20	40,60	1,25	39,35	__	11,00
5	167,40	140,00	26,00	1,64	24,36	24,80	13,00

__ ausência de auto-anticorpo; IU = unidade de auto-anticorpo.

Os experimentos de filtração foram realizados conforme o procedimento descrito em materiais e métodos. Como tampões de equilíbrio foram utilizados Hepes a 25 mM a pH 7,0 e Tris-HCl a 25 mM a pH 7,4 devido ao fato da adsorção de IgG em His-PEVA depender do tampão utilizado.

O tampão Tris-HCl difere do tampão Hepes pelo fato de promover a adsorção de IgG em quantidades similares dentro de sua faixa tamponante não dependendo muito do pH e Hepes, promove a adsorção de IgG em quantidades maiores quando utilizado em pHs abaixo do seu valor de pK_a, (a quantidade adsorvida decresce rapidamente com o aumento do pH). Com relação às

suas estruturas, Tris-HCl possui uma única carga, enquanto que Hepes possui duas cargas de sinais opostos em pHs abaixo do seu pK_a, como pode ser visualizado na figura 4.8.



Tris Hepes

Fig. 4.8 – Fórmulas estruturais dos tampões utilizados para a adsorção de auto-anticorpos em His-PEVA.

Estudos realizados por HAUPT et al. (1995), demonstraram que a distribuição de ponto isoelétrico de IgG na fração adsorvida depende também do tampão utilizado. Com tampão Tris-HCl a pH 8,5 o pI de IgG na fração adsorvida variou na faixa de 8,2 a 9,3 e para Hepes a pH 7,0, na faixa de 7,0 a 9,3. A composição das subclasses de IgG das frações retidas e não retidas também depende do sistema tamponante utilizado, Tris-HCl promove a adsorção de IgG_3 e parte de IgG_1 enquanto que Hepes promove a adsorção de IgG_1, IgG_2 e IgG_3.

Como descrito em MARAN et al. (1997), os auto-anticorpos presentes em pacientes com doenças sistêmicas são em sua maioria, imunoglobulinas G das subclasses 1 e 3. Diante desses estudos, resolveu-se utilizar também o tampão Tris-HCl como tampão de equilíbrio para verificar se alguma seletividade com relação a remoção dos auto-anticorpos poderia ser obtida em comparação com o tampão Hepes.

Escolhido os tampões de equilíbrio, os experimentos *in vitro* para a remoção de auto-anticorpos foram realizados como descrito em materiais e métodos (item 3.2.10). Ao término dos experimentos foi determinada, através do teste ELISA, a concentração de auto-anticorpos alimentada no módulo, concentração remanescente após 1 hora de recirculação e a concentração de auto-anticorpos nos volumes de lavagem e eluição. Não foi possível a determinação da

quantidade de auto-anticorpos presente nas frações de regeneração, pois certamente estes encontravam-se desnaturados. Os resultados estão apresentados na tabela 4.12.

Pelos resultados com o "pool" 1, observa-se que as capacidades de retenção (Cr) e adsorção (Ca) de anti-dsDNA, em presença de tampão Tris-HCl diferem-se em 18% e 16% respectivamente em relação aos resultados obtidos com o tampão Hepes. Analisando-se o "pool" 2, as diferenças entre os dois tampões para os valores das capacidades de adsorção e retenção não ultrapassam a 5%.

Em contraste aos resultados apresentados nos "pools" 1 e 2, para o "pool" 3, as capacidades de retenção e de adsorção de anti-SS-A/Ro em tampão Tris-HCl superam em 52% e 60% respectivamente aos valores obtidos com Hepes. Constata-se a possibilidade de existência de seletividade com utilização do tampão Tris-HCl para a remoção desse auto-anticorpo.

A análise do "pool" 4 mostra que para o auto-anticorpo anti-dsDNA, os valores encontram-se relativamente próximos para os tampões Hepes e Tris-HCl e, como ocorrido no "pool" 1, as diferenças entre as capacidades de retenção e adsorção foram menores que 20%, não apresentando variação frente aos resultados obtidos onde estão presentes outros tipos de auto-anticorpos no "pool". Para o auto-anticorpo anti-SS-A/Ro, a diferença entre as capacidades de retenção obtidas com o tampão Tris-HCl e Hepes foi de 74%, onde a maior remoção foi obtida com Tris-HCl. A porcentagem de anti-SS-A/Ro adsorvida com o tampão Tris-HCl foi de 9% e a obtida com o tampão Hepes foi de 5%, ressaltando-se que a capacidade de adsorção de anti-SSA/Ro em Tris-HCl superou em 100% aos valores obtidos com Hepes. Em relação ao auto-anticorpo anti-Sm/RNP, a capacidade de retenção em Hepes é maior que a obtida em Tris-HCl (33%) e as porcentagens adsorvidas diferem-se em 2%. Não foi possível obter as quantidades referentes a eluição e a lavagem desse auto-anticorpo, pois os valores encontravam-se abaixo do mínimo positivo detectado pelo teste. Os valores de capacidade de retenção para este auto-anticorpo, nos experimentos com Tris-HCl e Hepes, foi o mesmo.

Analisando-se os experimentos com o "pool" 5, para o auto-anticorpo anti-dsDNA as diferenças de capacidade de retenção e adsorção entre os dois tampões é inferior a 20%, fato também observado com o "pool" 4. Para o auto-anticorpo anti-SS-A/Ro, os valores encontrados com a utilização do tampão Tris-HCl são bem maiores que os resultados encontrados com tampão

Hepes, as capacidades de retenção e adsorção de anti-SS-A/Ro em tampão Tris-HCl superaram em 100% aos resultados encontrados com o tampão Hepes. As capacidades de retenção de anti-Sm/RNP e anti-cardiolipina obtidas com Tris-HCl diferem-se em 14% e 13%, respectivamente, em relação aos resultados obtidos com Hepes. Os valores de capacidade de retenção e adsorção do auto-anticorpo anti-Sm foram equivalentes na utilização dos tampões Hepes e Tris-HCl, conforme observado com o "pool"4.

Tabela 4.12 - Resultados experimentais de retenção e adsorção dos auto-anticorpos anti-dsDNA, anti-SS-A/Ro, anti-Sm e anti-Sm/RNP no módulo de membranas de fibras ocas His-PEVA.

"Pool"	Tampão	Auto-Anticorpo	PRE * (IU/ml)	POS* (IU/ml)	UR * (IU)	L * (IU)	E * (IU)	% R *	%A*	Cr * (IU/cm^2)	Ca * (IU/cm^2)
1	Hepes	anti-dsDNA	65,3	19,4	400	252	91	67	15	8	1,8
	Tris-HCl	anti-dsDNA	65,3	12,3	471	286	107	79	18	9,4	2,1
2	Hepes	anti-dsDNA	202,8	71	1134	640	432	62	23	22,5	8,6
	Tris-HCl	anti-dsDNA	202,8	74,5	1099	590	420,9	60	23	21,8	8,4
3	Hepes	anti-SS-A/Ro	72,6	40,9	251	210	22,7	38	3	5	0,5
	Tris-HCl	anti-SS-A/Ro	72,6	27,7	383	317,2	39,9	58	6	7,6	0,8
4	Hepes	anti-dsDNA	52,6	21,4	264	210	25,2	55	5	5,2	0,5
		anti-SS-A/Ro	49,6	25,4	197	160	20,5	44	5	3,9	0,4
		anti-Sm	1,3	0,4	7,8	-#	-#	66	-#	0,2	-#
		anti-Sm/RNP	20,3	7,8	107	87	12,6	58	7	2,1	0,3
	Tris-HCl	anti-dsDNA	52,6	17,3	305	240	18,3	64	4	6,1	0,4
		anti-SS-A/Ro	49,6	11,1	340	276	39,6	75	9	6,8	0,8
		anti-Sm	1,3	0,4	7,8	-#	-#	66	-#	0,2	-#
		anti-Sm/RNP	20,3	11,4	71	55,2	9,1	38	5	1,4	0,2
5	Hepes	anti-dsDNA	83,7	38,5	376	235,6	123,6	49	16	7,5	2,5
		anti-SS-A/Ro	70	48,6	150	111,6	22	24	3	3	0,4
		anti-Sm	1,6	0,9	5,5	-#	-#	38	-#	0,1	-#
		anti-Sm/RNP	13,0	8,3	35	23,6	7,5	29	6	0,7	0,2
		anti-cardiolipina	12,4	7,1	42	24,8	13,2	37	12	0,8	0,3
	Tris-HCl	anti-dsDNA	83,7	34,5	416	265	98	55	13	8,3	2,0
		anti-SS-A/Ro	70	31	326	250	50,4	51	8	6,5	1
		anti-Sm	1,6	0,9	5,5	-#	-#	38	-#	0,1	-#
		anti-Sm/RNP	13	8,7	31	22,4	5,6	26	5	0,6	0,1
		anti-cardiolipina	12,4	8	33	18	9,8	30	9	0,7	0,2

* PRE = concentração de auto-anticorpo na alimentação; POS = concentração de auto-anticorpo no reservatório após 1 hora de recirculação; UR = unidades retidas de auto-anticorpo em His-PEVA após 1 hora de recirculação; L = unidades de auto-anticorpos no volume de lavagem;

Para os "pools" 4 e 5, onde se encontram vários tipos de auto-anticorpos fez-se uma representação gráfica dos resultados para uma melhor visualização do processo (figuras 4.9, 4.10, 4.11, 4.12).

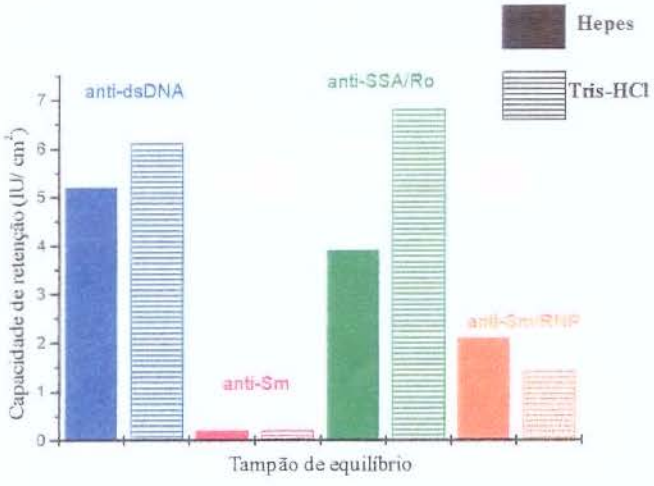


Fig. 4.9 - Representação gráfica dos resultados de capacidade de retenção dos auto-anticorpos presentes no "pool" 4 em His-PEVA.

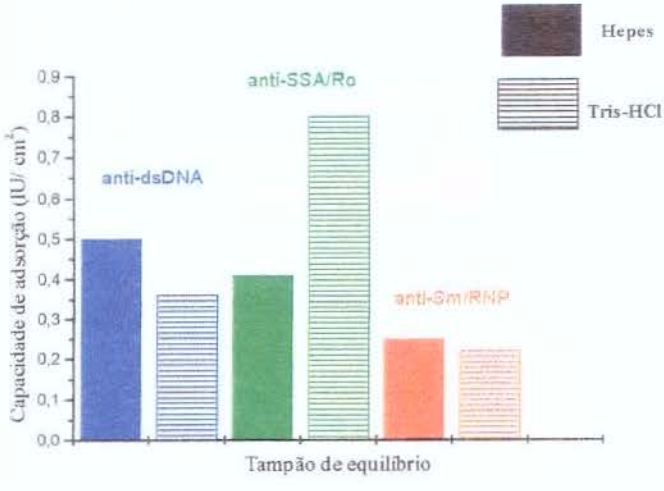


Fig. 4.10 - Representação gráfica dos resultados de capacidade de adsorção dos auto-anticorpos presentes no "pool" 4 em His-PEVA.

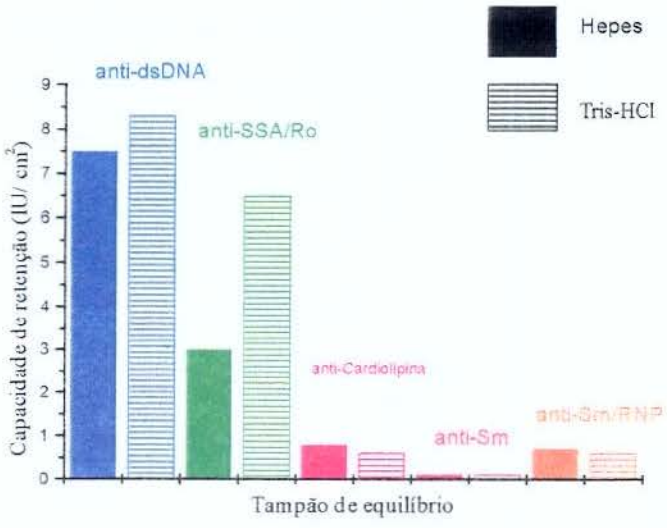


Fig. 4.11 - Representação gráfica dos resultados de capacidade de retenção dos auto-anticorpos presentes no "pool" 5 em His-PEVA.

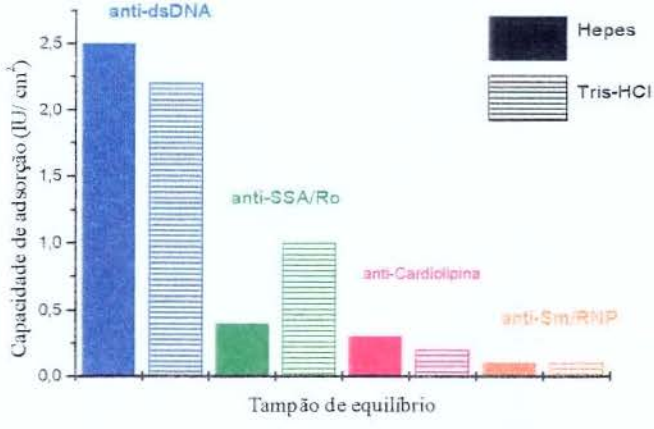


Fig. 4.12 - Representação gráfica dos resultados de capacidade de adsorção dos auto-anticorpos presentes no "pool" 5 em His-PEVA.

Nos experimentos com os "pools" de amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes tem-se que apenas para o auto-anticorpo anti-SS-A/Ro foi obtida uma variação de

resultados significativa na utilização dos tampões Hepes a 25 mM a pH 7,0 e Tris-HCl a 25 mM a pH 7,4 onde o tampão Tris-HCl apresentou maior capacidade de retenção e adsorção.

Uma provável explicação para esse fato seria que com a utilização do tampão Tris-HCl a pH 7,4, são adsorvidas especificamente em His-PEVA as subclasses 1 e 3 de imunoglobulinas G e com a utilização do tampão Hepes a pH 7,0 são adsorvidas em His-PEVA as subclasses 1, 2 e 3. Com Hepes haveria uma maior competição entre as imunoglobulinas pelos sítios de ligação da histidina, que poderiam ser ocupados por imunoglobulinas que não seriam especificamente auto-anticorpos e de subclasses 1 e 3. Já com Tris-HCl, haveria uma maior especificidade que promoveria uma melhor adsorção dos auto-anticorpos nesse sistema de afinidade, uma vez que MARAN et al. (1997) demonstraram evidências de que os auto-anticorpos em doenças sistêmicas são em sua maioria IgG_1 e IgG_3, e supostamente os auto-anticorpos anti-SS-A/Ro estudados seriam dessas subclasses (MARAN et al., 1993; BENNION et al., 1990). Portanto, para a remoção do auto-anticorpo anti-SS-A/Ro, a utilização do tampão Tris-HCl seria a mais adequada, enquanto que para a remoção dos outros auto-anticorpos estudados, poderiam ser utilizados tanto o tampão Tris-HCl quanto o tampão Hepes.

Há vários dados em literatura referentes ao tratamento extracorpóreo de pacientes com doenças auto-imunes, contudo, estes estão voltados para a situação clínica do paciente, sendo que a maioria dos trabalhos não divulga valores de capacidades de retenção (IU/cm^2, IU/ g suporte) e adsorção (IU/cm^2, IU/ g suporte) dos sistemas de afinidade empregados. Para a comparação dos resultados de remoção de auto-anticorpos desse estudo com trabalhos publicados, imaginou-se um processo extracorpóreo em grande escala baseando-se nos resultados aqui relatados através de experimentos *in vitro*.

Remoção de IgG: Comparação entre os sistemas de afinidade His-PEVA e Phe-PVA

Considerando-se a utilização de um cartucho de membranas His-PEVA de 2 m^2 (44 ml) para o tratamento extracorpóreo de um paciente contendo auto-anticorpos anti-dsDNA em uma concentração inicial no plasma de 50 IU/ml, valor equivalente a quantidade de anti-dsDNA

presente no "pool" 4, onde a capacidade de adsorção de anti-dsDNA em His-PEVA obtida foi igual a 0,5 IU/cm^2 em presença de tampão Hepes (tabela 4.12) e fazendo o tratamento de 2 litros de plasma do paciente em um período de 3 horas (correspondente a uma sessão extracorpórea), após três sessões de tratamento, a quantidade de auto-anticorpo adsorvida por volume de suporte seria de 682 IU de anti-dsDNA /ml de His-PEVA.

Comparando-se o sistema His-PEVA com o sistema onde utiliza-se fenilalanina imobilizada em gel de álcool poli vinílico (SCHENEIDER et al., 1990) e um volume de leito de 300 ml, fazendo-se o tratamento de 2 litros de plasma do paciente, após três sessões de tratamento a quantidade de auto-anticorpo adsorvida por volume de suporte obtida foi de 267 IU/ml, sendo que com a utilização do sistema His-PEVA obteríamos teoricamente um valor 2,6 vezes maior que a do suporte *Phe*-PVA.

Quanto à quantidade de auto-anticorpos presentes no plasma do paciente após as três sessões de tratamento extracorpóreo, com o sistema His-PEVA restariam 10.000 IU de anti-dsDNA e com o suporte *Phe*-PVA restariam 20.000 IU de anti-dsDNA. Os cálculos para a comparação dos suportes estão apresentados no anexo.

Uma vez que o sistema mostrou-se eficaz para a remoção *in vitro* dos auto-anticorpos, avaliou-se, também, a adsorção e a retenção de IgG, IgM e IgA desses experimentos, pois os auto-anticorpos estudados podem ser dessas três classes de imunoglobulinas. Investigou-se também a perda de albumina no processo, pois uma das maiores vantagens da terapêutica das doenças auto-imunes por adsorção seletiva sobre a troca de plasma, é a eliminação da necessidade de reposição de proteínas essenciais ao paciente minimizando os riscos de contração de infecções virais e outras complicações.

Avaliação da adsorção e da retenção de IgG, IgM, IgA e albumina em His-PEVA

Na tabela 4.13 estão apresentados os resultados referentes às análises nefelométricas de IgG, IgM, IgA e albumina dos experimentos com "pools" de amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes.

Em relação à IgG, para os "pools" 1 e 2, a capacidade de retenção e a capacidade de adsorção são menores em 30% e 75%, respectivamente, na presença de tampão Tris-HCl em relação aos experimentos com o tampão Hepes. Para o "pool" 3, essas diferenças foram de 20% na capacidade de retenção e de 60% nas capacidade de adsorção. Para os "pools" 4 e 5 não houveram diferenças entre as capacidades de retenção na utilização de Hepes e Tris-HCl; em contrapartida, as capacidades de adsorção diferiram em 66% para o "pool" 4 e em 60% para o "pool" 5 onde os valores maiores foram obtidos em presença de tampão Hepes.

Os resultados de capacidade de adsorção mostraram-se superiores em presença de tampão Hepes, pelo fato desse tampão promover maior adsorção de IgG, comparado à outros tampões como Tris-HCl a 25 mM a pH 7,4 como observado em HAUPT et al. (1995). Para explicar esse fenômeno de adsorção há a seguinte hipótese: os íons do tampão Tris-HCl e os respectivos contra-íons interagem com as moléculas da proteína via carga-carga e ocultam o sítio de ligação da histidina porém, Hepes na sua forma zwiteriônica não o faz.

A porcentagem média removida (%R) de IgG dos experimentos com o tampão Hepes foi de 69% e em relação aos experimentos com Tris-HCl foi de 60%. Para os resultados de porcentagem adsorvida (%A), há uma diferença maior entre a utilização dos dois tampões sendo de 7,4% para os experimentos com Hepes e de 2,2% para os experimentos com Tris-HCl.

Comparando-se os resultados de adsorção de IgG obtidos nesse trabalho com dados publicados em outros sistemas de afinidade, verifica-se que a maior capacidade obtida do sistema His-PEVA foi de 50 mg de IgG/ml, salientando-se que, nesse estudo, provavelmente a saturação da membrana não foi atingida e a capacidade máxima do sistema que utiliza proteína A recombinante imobilizada em fibras ocas de polisulfona (KLEIN et al.,1994) foi de 28 mg de IgG/ml. Evidencia-se que a capacidade do sistema His-PEVA é maior que a do suporte proteína A-polisulfona, fato também constatado por BUENO et al (1996), onde o resultado obtido de capacidade máxima de adsorção de IgG em His-PEVA, em modo dinâmico, foi de 86 mg de IgG/ml, ou seja, 3 vezes maior que o obtido por KLEIN et al. (1994).

Tabela 4.13 - Resultados experimentais referentes as análises nefelométricas realizadas para verificar a adsorção e retenção em His-PEVA de IgG, IgM, IgA e albumina.

"Pool"		1		2		3		4		5	
Tampão		H*	Tr*	H	Tr	H	Tr	H	Tr	H	Tr
PRE* (mg/ml)	IgG	6,1	6,1	6,0	6,0	7,0	7,0	9,8	9,8	10,2	10,2
	IgM	0,4	0,4	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	IgA	1,2	1,2	1,6	1,6	1,3	1,3	1,6	1,6	1,6	1,6
	Alb	14,1	14,1	15,6	15,6	15,5	15,5	16,0	16,0	15,5	15,5
POS* (mg/ml)	IgG	1,2	2,0	2,1	3,0	1,5	2,3	2,8	3,0	3,7	3,8
	IgM	0,03	0,04	0,03	0,16	0,13	0,04	0,06	0,02	0,14	0,13
	IgA	0,2	0,3	0,6	0,6	0,4	0,6	0,3	0,6	0,7	0,6
	Alb	5,2	6,6	9,7	9,6	7,3	7,8	8,3	6,9	9,6	9,2
MR* (mg)	IgG	43,5	35,5	33,5	24,5	48,6	40,6	61,1	59,1	55,7	54,7
	IgM	3,3	3,2	5,2	3,9	3,2	4,1	3,9	4,3	3,1	3,2
	IgA	8,9	7,9	8,5	8,5	7,8	5,8	11,5	8,5	7,5	8,5
	Alb	76,2	62,2	44,8	45,8	67,9	62,9	62,5	76,5	44,9	48,9
L* (mg)	IgG	34,8	32,5	25,1	22,1	37,0	36,6	52,0	53,0	45,3	47,7
	IgM	2,7	2,9	4,6	3,7	2,8	3,5	3,3	3,5	2,2	2,5
	IgA	7,8	7,15	8,0	7,9	6,0	4,7	9,0	7,1	6,2	6,3
	Alb	81,4	67,7	51,5	54,3	78,6	69,5	71,9	84,4	56,0	56,4
E* (mg)	IgG	5,2	1,3	3,8	1,0	5,0	2,1	5,3	1,8	5,5	2,2
	IgM	0,4	0,2	0,7	0,4	0,3	0,3	0,5	0,2	0,5	0,3
	IgA	0,13	0,18	0,12	0,11	- [a]	- [a]	0,11	- [a]	- [a]	0,12
	Alb	0,25	0,35	0,47	0,54	0,55	0,46	0,47	0,33	0,37	0,31
%R*	IgG	78	64	61	49	76	64	69	66	60	59
	IgM	91	88	95	71	70	90	86	77	68	70
	IgA	82	72	58	58	66	49	79	58	52	58
	Alb	59	49	32	32	48	45	43	53	32	35
%A*	IgG	9	2	7	2	9	3	6	2	6	2
	IgM	11	6	13	7	7	7	11	4	11	7
	IgA	1,2	1,7	0,8	0,7	- [a]	- [a]	0,7	- [a]	- [a]	0,8
	Alb	0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
Cr* (mg/cm^2)	IgG	0,9	0,6	0,7	0,5	1,0	0,8	1,2	1,2	1,1	1,1
	IgM	0,07	0,06	0,1	0,08	0,06	0,08	0,08	0,09	0,06	0,06
	IgA	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2
	Alb	1,5	1,2	0,9	0,9	1,3	1,3	1,2	1,5	0,9	1,0
Ca* ($\mu g/cm^2$)	IgG	103,4	25,8	75,5	19,9	99,4	41,7	105,4	35,8	109,3	43,7
	IgM	8,0	4,0	13,9	8,0	6,0	6,0	9,9	4,0	9,9	6,0
	IgA	2,6	4,0	2,4	2,2	- [a]	- [a]	2,2	- [a]	- [a]	2,4
	Alb	5,0	7,0	9,4	10,7	10,9	9,1	9,3	6,6	7,4	6,2

*H = tampão Hepes a 25 mM a pH 7,0; Tr = tampão Tris-HCl a 25 mM a pH 7,4; PRE = concentração de proteína na alimentação; POS = concentração de proteína no reservatório após 1 hora de recirculação; MR = massa de proteína retida em His-PEVA; L = massa de proteína obtida na etapa de lavagem do módulo; E = massa de proteína obtida na etapa de eluição; %R = porcentagem de proteína removida; %A = porcentagem de proteína adsorvida; Cr = capacidade de retenção de proteína em His-PEVA; Ca = capacidade de adsorção de proteína em His-PEVA; [a] - = abaixo do limite de detecção do método.

Analisando-se os resultados referentes à IgM, observa-se que a diferença na capacidade de retenção em relação a utilização dos dois tampões não ultrapassa a 35%. Avaliando-se as capacidades de adsorção, para todos os "pools" com exceção do "pool" 3, esta mostrou-se maior com a utilização do tampão Hepes, onde para o "pool" 3 a capacidade de adsorção foi a mesma nos experimentos com Hepes e Tris-HCl. As porcentagens removidas (%R) para todos os "pools" foram em média de 82% para os experimentos com Hepes e 79% para os experimentos com Tris-HCl e as porcentagens adsorvidas (%A), foram de 10% e 6% para os experimentos com Hepes e Tris-HCl respectivamente.

As porcentagens adsorvidas (%A) de IgM em His-PEVA mostraram-se maiores que os valores obtidos com IgG em ambos os tampões Hepes e Tris-HCl. O mesmo fato foi observado nas porcentagens removidas (%R) dessas proteínas.

Em relação aos resultados obtidos da análise de IgA, praticamente não há adsorção dessa proteína em His-PEVA. Os valores de capacidade de adsorção e porcentagem adsorvida (%A) são pequenos quando essa proteína foi detectada no volume de eluição. Analisando-se a retenção, não se constatou diferenças significativas na capacidade de retenção de IgA em His-PEVA na utilização dos tampões de equilíbrio Hepes e Tris-HCl para os "pools" estudados. A porcentagem média removida de IgA foi de 67% para os experimentos com Hepes e de 59% para os experimentos com Tris-HCl e a porcentagem média adsorvida foi de 0,5% e 0,6% respectivamente para os experimentos com Hepes e Tris-HCl.

Na análise de albumina dos experimentos com amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes observa-se que a diferença entre as capacidades de retenção dos experimentos não ultrapassa 25%. As variações entre as capacidades de adsorção com os tampões Hepes e Tris-HCl, para os "pools" 2, 3 e 5 foram menores que 20%, para os "pools" 1 e 4 foram de 40% e 30% respectivamente onde os resultados de maior adsorção foram obtidos em presença de tampão Hepes. No entanto, pode ser observado que a perda média de albumina em relação a porcentagem adsorvida em His-PEVA é de 0,3%.

Considerando os resultados de perda de albumina apresentados, a quantidade adsorvida dessa proteína seria muito pequena no caso de um tratamento extracorpóreo podendo a reposição dessa proteína no paciente ser minimizada ou eliminada na utilização do sistema His-PEVA da seguinte forma: o sangue do paciente seria coletado com anticoagulante pela veia periferal e

passaria por um separador de plasma, promovendo a separação dos componentes celulares e plasma. O plasma seria diluído em tampão Tris-HCl ou Hepes, que provocaria modificação em seu pH. Essa solução seria recirculada em um cartucho contendo His-PEVA onde os auto-anticorpos seriam adsorvidos. As proteínas não adsorvidas, incluindo a albumina, seriam removidas do interior das fibras através de uma lavagem do módulo com o tampão de equilíbrio e a solução protéica obtida passaria por diálise e ultrafiltração para ajuste de pH e remoção do tampão, retornando ao paciente, conforme representado na figura 4.13.

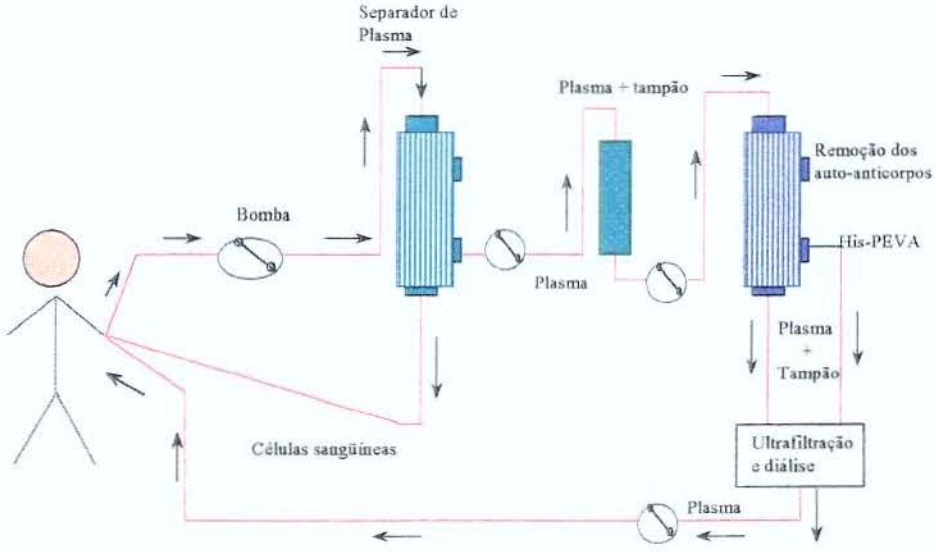


Fig. 4.13 - Simulação de uma sessão de tratamento extracorpóreo para a remoção de auto-anticorpos utilizando o sistema de afinidade His-PEVA

Pelos resultados observados nesse estudo, o sistema His-PEVA proposto apresenta-se como uma possível alternativa aos tratamentos extracorpóreos existentes para a remoção de auto-anticorpos de pacientes com doenças auto-imunes que utilizam outros sistemas de afinidade.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

5.1. CONCLUSÕES

O aminoácido histidina imobilizado em membranas de fibras ocas foi avaliado neste trabalho como ligante de afinidade para a remoção de auto-anticorpos de amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes.

Inicialmente, utilizou-se as membranas de fibras ocas de PVA, como matriz para a imobilização de histidina e observou-se através de uma eletroforese SDS-PAGE que houve seletividade desse suporte em relação à adsorção de IgG humana. Mais tarde, porém, tomou-se ciência que estas membranas não estavam mais sendo fabricadas e optou-se por interromper o seu estudo e utilizar as membranas de fibras ocas de PEVA como suporte para a imobilização de histidina, uma vez que BUENO et al. (1995A, 1995B e 1996) desenvolveram estudos promissores com relação à adsorção de IgG humana desse suporte.

Os resultados dos experimentos com as fibras His-PEVA finamente cortadas mostraram, de maneira qualitativa, que os auto-anticorpos foram adsorvidos em His-PEVA. Como o objetivo principal desse trabalho era a detecção das quantidades de auto-anticorpos que seriam removidas com a utilização desse suporte, houve a necessidade de se definir uma outra estratégia para a execução dos experimentos de forma a possibilitar uma detecção quantitativa dos auto-anticorpos.

Através de planejamento experimental, foi investigada a influência da razão Q_F/Q_I e concentração de IgG na alimentação sobre a capacidade de retenção de IgG em His-PEVA. Os resultados obtidos mostraram que dentro das faixas de valores estudadas, Q_F/Q_I não apresentou um efeito significativo na retenção de IgG. O planejamento também possibilitou constatar que a

capacidade de retenção de IgG aumentou de acordo com a concentração de IgG na alimentação (quanto maior a concentração, maior a quantidade retida por unidade de área da membrana) e que a capacidade máxima de retenção das membranas His-PEVA não foi atingida (obteve-se com os experimentos realizados, uma retenção de 2,076 mg/ml). Devido à ausência da necessidade de se expandir o planejamento utilizando-se maiores concentrações de IgG na alimentação que as já estudadas, (uma vez que não se encontram pacientes com os níveis maiores que os estudados), testou-se plasma humano sadio e verificou-se que a presença de proteínas diferentes de IgG não afetaram na retenção de IgG e que as capacidades de retenção obtidas nesses experimentos são similares às encontradas nos experimentos com IgG pura.

Como etapa final, verificou-se a adsorção e a retenção dos auto-anticorpos de amostras séricas de pacientes, detectando-se a presença dos mesmos nos volumes de lavagem e eluição. Para estes experimentos foram utilizados dois tampões de equilíbrio (Hepes a 25 mM a pH 7,0 e Tris-HCl a 25 mM a pH 7,4), com o objetivo de verificar alguma seletividade com relação à adsorção e à retenção dos auto-anticorpos. O tampão Tris-HCl exibiu valores superiores de capacidade de retenção e adsorção do auto-anticorpo anti-SS-A/Ro comparado ao tampão Hepes, onde os resultados obtidos superaram em 100% aos resultados com Hepes.

A título de comparação com outros sistemas de afinidade, imaginou-se um tratamento extracorpóreo *in vivo* utilizando-se His-PEVA para a remoção do auto-anticorpo anti-dsDNA onde se detectou que a quantidade de anti-dsDNA removida por volume de leito utilizado seria supostamente 2,6 vezes maior que a do sistema *Phe*-PEVA utilizado por SCHENEIDER et al. (1998).

Em relação à adsorção de proteínas em His-PEVA, foi observado que IgG é adsorvida em maior quantidade quando é utilizado Hepes como tampão de equilíbrio, conforme observado por HAUPT et al. (1995). O suporte His-PEVA mostrou-se capaz de adsorver IgG em quantidades maiores que as observadas com a utilização do sistema proteína A-polisulfona retratado por KLEIN et al. (1994), confirmando-se os resultados obtidos por BUENO et al. (1996). IgM foi adsorvida em maior quantidade em comparação com IgG em His-PEVA e a adsorção de IgA em His-PEVA foi praticamente insignificante atingindo valores abaixo do limite mínimo de detecção do teste. A perda de albumina considerando-se a adsorção em His-PEVA é de aproximadamente 0,3%, podendo a sua reposição no caso de utilização de His-PEVA em um sistema extracorpóreo

in vivo ser minimizada ou eliminada.

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que o processo de filtração em membranas de fibras ocas His-PEVA mostrou-se capaz de remover os auto-anticorpos patogênicos de amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes podendo, desse modo, vir a contribuir para o avanço do estudo da terapêutica das doenças por auto-imunidade.

5.2. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Como ocorre em muitos trabalhos experimentais, nesse estudo de remoção de auto-anticorpos de pacientes com doenças auto-imunes, surgiram várias dificuldades para se atingir a resolução do objetivo proposto. Muitas vezes, deparamos com vários obstáculos onde tivemos que escolher uma alternativa mais viável para a continuação dos trabalhos experimentais, como a escolha da melhor membrana a ser utilizada e a dificuldade de obtenção de resultados quantitativos nos experimentos com amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes em membranas His-PEVA finamente cortadas, onde as alternativas escolhidas mostraram-se as mais viáveis de acordo com o andamento da pesquisa.

Como foi atingido o objetivo inicial proposto, através dos resultados finais de remoção/adsorção de auto-anticorpos em membranas His-PEVA, acredita-se que esse tema de pesquisa deverá ser mais explorado. Muitos são os caminhos que poderão ser seguidos devido à complexidade e multiplicidade de fatores que esse tema apresenta.

Várias são as sugestões àqueles que darão continuidade a esse trabalho. Uma sugestão seria a realização de um processo de tratamento extracorpóreo *in vitro* para a remoção dos auto-anticorpos, conforme o utilizado nesse estudo, fazendo-se algumas modificações no procedimento dos experimentos como: uma lavagem rápida no interior dos poros das membranas His-PEVA contidas no módulo, retornando o conteúdo de proteínas aderidas à membrana sem qualquer interação com a mesma para o reservatório. A medida de concentração final de IgG no reservatório após a recirculação da solução pelo módulo seria feita após essa lavagem e a quantidade de auto-anticorpos retidas em His-PEVA seria verificada com uma melhor eficácia.

Outra sugestão seria realizar os experimentos de filtração de auto-anticorpos utilizando-se

um módulo maior de 2 m^2 de área superficial interna das membranas e verificar se os resultados são reprodutíveis em relação aos obtidos nesse estudo. Além disso sugeriria:

- Investigar, através de análise de custo, a viabilidade desse suporte na aplicação em um tratamento extracorpóreo de pacientes com doenças auto-imunes comparando-se com os suportes já disponíveis para tratamento *in vivo*.
- Analisar a adsorção do auto-anticorpo SS-A/Ro em His-PEVA na presença de tampão Tris-HCl, comparando-se com os resultados de adsorção obtidos com o tampão Hepes.
- Determinar a necessidade de reposição ao paciente de proteínas como complementos, fibrinogênio, etc.
- Investigar a possibilidade de se tratar o volume de lavagem, onde poder-se-ia implantar um novo sistema para a adsorção dos auto-anticorpos presentes nesta fração. As proteínas provenientes da lavagem posteriormente tratada retornariam ao paciente.
- Verificação da implantação de um sistema para a retirada do tampão de equilíbrio da solução de plasma de modo que este não venha a causar danos ao paciente.
- Verificação quantitativa da histidina imobilizada em His-PEVA e investigação de um método para dosagem de histidina após a utilização do módulo em sessões extracorpóreas.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCONCI, C. Processo de remoção de endotoxinas de soros hiperimunes: filtração em membranas de afinidade. FEQ, UNICAMP, 1998. Tese (mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1998.

ACCONCI, C. e BUENO, S.M.A Remoção de endotoxinas de soros hiperimunes por adsorção em membranas de afinidade. Anais do Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados (XXV ENEMP, (2), São Carlos, 20 a 23 de outubro de 1997.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. e POBER, J.S. Cellular and Molecular Immunology W.B. Saunders Company, Philadelphia, 3ª ed, 1997.

ARBISER, J.L.; DZIECZKOWSKI, J.S.; HARMON, J.V. e DUNCAN L.M. Leukocytoclastic Vasculitis Following Staphylococcal Protein A Column Immunoadsorption Therapy. ARCH Dermatology, **131**, 707-709, 1995.

AKERSTRÖM, BO; BRODIN, T.; REIS, K. e BJÖRCK, L. Protein G: A powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. The Journal of Immunology , **135**, 1985.

BALINT, J.P; SNYDER, H.W.; COCHRAN, S.K. e JONES, F.R. Long term response of immune thrombocytopenia to extracorporeal immunoadsorption. Lancet, **337**, 1106, 1991.

BALINT, J. P.; SHARON, K. C. E JONES, F. R. Modulation of idiotipic and antiidiotipic immunoglobulin G responses in an immune trombocytopenic purpura patient as a consequence of extracorporeal protein A immunoadsorption. The International Journal of Artificial Organs, **19**, 496-499, 1995.

BANSAL, S. C.; BANSAL, B. R.; THOMAS, H.L.; SIEGEL, P.D.; RHOADS, J. E.; COOPER, D. R.; TERMAN, D. S. e MARK, R. Ex vivo removal of serum IgG in a patient with colon carcinoma. Cancer, **42,** 1-18, 1978.

BAROCCI, S. e 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, **6**, 29-33, 1993.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S. e BRUNS, R.E. Planejamento e Otimização de Experimentos. Editora da Unicamp, Campinas, 2ª ed., 1996.

BENNION, S.D.; FERRIS, C.; LIEU, T.S.; REIMER, C.B. e LEE, L.A. IgG subclasses in the serum and skin in subacute cutaneous lupus-erythematosus and neonatal lupus-erythematosus. Journal of Investigative Dermatology, **95**, 643-646, 1990.

BERTA, E.; CONFALONIERI, P.; SIMONCINI, O.; BERNARDI, G.; BUNASCH, G.; MANTEGAZZA, R.; CORNELIO, F. e ANTOZZI, C. Removal ofantiacetylcholine receptor antibodies by protein A immunoadsorption in myasthenia gravis. The International Journal of Artificial Organs, **17**, 603-608, 1994.

BJÖRCK, L. e KRONVALL, G. Purification and some properties of streptococcal protein G. A novel IgG-binding reagent. The Journal of Immunology, **133**, 969-974, 1984.

BOITARD, C. Les maladies auto-imunes. Supplement de la Recherche, **237**, 15-17, 1991.

BOYLE, M.D.P. e REIS, K.J. Bacterial Fc Receptors. Bio/Technology, **5**, 1987.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye-Binding. Analitical Biochemistry, **72**, 248-254, 1976.

BRANDT, S.; GOFFE, R.A.; KESSLER, S.B.; O'CONOR, J.L e ZALE, S.E. Membrane-based affinity technology for commercial scale purifications. Biotechnology, **6**, 779-782, 1988.

BUENO, S.M.A.; HAUPT, K.; VIJAYALAKSHMI, M.A. Separation of immunoglobulin G from human serum by pseudobioaffinity chromatography using immoblilized L-histidine in hollow fibre membranes. Journal of Chromatography B, **667**, 57-67, 1995a.

BUENO, S.M.A.; HAUPT, K. e VIJAYALAKSHMI, M.A. In vitro removal of human IgG by pseudobioespecific affinity membrane filtration on a large scale. A preliminary report. The International Journal of Artificial Organs, **18** , 392-398, 1995b.

BUENO, S.M.A.; LEGALLAIS, C.; HAUPT, K. e VIJAYALAKSHMI, M.A. Experimental kinetic aspects of hollow fiber membrane-based pseudobioaffinity filtration: process for IgG separation from human plasma. Journal of Membrane Science, **117**, 45-56, 1996.

BURNOUF, T. Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends. Journal of Chromatography B, **664**, 3-15, 1995.

CHARCOSSET, C. Purification of Proteins by Membrane Chromatography. J. Chem. Technol. Biotechnology, **71**, 95-110, 1998.

CHEN, J.P. e HOFFMAN, A.S. Affinity preciptation separation of human immunogammaglobulin by a poly(N-isopropylacrylamide) - protein A conjugate Biomaterials, **11**, 631-634, 1990.

DARNIGE, L.; LEGALLAIS, C.; ARVIEUX, J.; VILCOT, J.R.; PITIOT, O. e VIJAYALAKSHMI, M.A. A functionalized hollow fiber membrane cartridge (HFC) for adsorption of "anticofactor/antiphospholipid antibodies" (APL): A potential tool for treatment. Artificial Organs 1999 (no prelo: setembro de 1999).

EL-KAK, A. e VIJAYALAKSHMI, M.A. Separation and purification of IgG_1 and IgG_2 from IgG-Cohn-II fraction of human plasma by pseudobioaffinity chromatography on histidyl-AH-sepharose. Bioseparation, **3**, 47-53, 1992.

ESNAULT, V.L.M; TESTA, A.; JAYNE, D.R.W.; SOULILLOU, J.P.; GUENEL, J. Influence of Immunoadsorption on the Removal of Immunoglobulin G Autoantibodies in Crescentic Glomerulonephritis. Nephron, **65**, 180-184, 1993.

EZZEDINE E.; LAWNY, F. e VIJAYALAKSHMI, M.A. Purification and depyrogenation of antihemophilic FVIII:C from human plasma. Technology of Blood Proteins, **227**, 115-123, 1993.

FERREIRA, A.W. e ÁVILA, S.L.M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes , Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.

HABIB, R.E.; COULET, P.R.; SANHADJI, K.; GAUTHERON, D.C.; LAVILLE, M. e TRAEGER, J. DNA immobilized onto Acyl-Azide Derivative of Collagen Membranes for Use as Immunoadsorbent. Biotechnology and Bioengineering, **26**, 665-669, 1984.

HAUPT, K.; BUENO, S.M.A. e VIJAYALAKSHMI, M.A. Interaction of human immunoglobulin G onto poly(ethylene vinyl alcohol) hollow-fiber membranes. Journal of Chromatography B, **674**, 13-21, 1995.

HOFFMAN, W.S. The biochemistry of clinical medicine. Year Book Medical Publishers, Chicago, 4ª ed., 1970.

IKOMONOV, V.; SAMTLEBEN, W.; SCHIMIDT, B.; BLUMENSTEIN, M.; e GURLAND, H.J. Adsorption profile of commercially available adsorbents: an in vivo evaluation. The International Journal of Artificial Organs, **15**, 312-319, 1992.

KÄBISCH, A.; KROLL, H.; WEDI, B.; KIEFEL, V.; PRALLE, H. e ECKHARDT, C.M. Severe adsverse effects of protein A Immunoadsorption. The Lancet, **343**, 116, 1994.

KLEIN, E.; EICHHOLTZ, E. e YEAGER, D.H. Affinity membrane prepared from hydrophilic coatings on microporous polysulfone hollow fibers. Journal of Membrane Science, **90**, 69-80, 1994.

LAHITA, R.G. Systemic Lupus Erythematosus. Churchill Livingstone Inc, 2ª ed., 1992.

LEGALLAIS, C.; JAFFRIN, M.Y. e WOOJCICKI, J. The effect of protein adsorption on ApoB removal and selectivity in plasma fractionation by membrane. Journal of Membrane Science, **91**, 97-110, 1994.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L. e COX, M.M. Principles of Biochemistry. 2ª ed., 1997.

LETOURNEUR, D. e JOZEFOWICZ, M. Insoluble DNA-like phosphorylated polystyrene: specific interactions with anti-DNA antibodies from systemic lupus

erythematosus patients. Biomaterials, **13**, 1992.

LINDMARK, R.; THORÉN-TOLLING, K. e SJÖQUIST, J. Binding of Immunoglobulins to protein A and Immunoglobulin Levels in Mammalian Sera. Journal of Immunological Methods, **62**, 1-13, 1983.

MALCHESKY, P.S.; KAPLAN, A.; KOO, A.P.; SAKURADA, Y. e SIAMI, G. A. Are selective macromolecule removal plasmapheresis systems useful for autoimmune diseases or hiperlipidemia? ASAIO Journal, 868-872, 1993.

MANDARO, R.M.; ROY, S. e KENNETH, C.H. Filtration suports for affinity separations Biotechnology, **5**, 928-932, 1987.

MARAN, R., PENNEC, YL, DUEYMES, M., SHOENFELD, Y. e YOUINOU, P. Predominance of the subclass IgGL, among the anti-Ro SSA antibodies, but not among the anti-La SSB antibodies in primary Gougerot-Sjögren Syndrome, Revue de Medicine Interne, **14**, 446-446, 1993.

MARAN, R.; DUEYMES, M.; LE CORRE, R.; RENAUDINEAU, Y.; SHOENFELD, Y. e YOUINOU, P. IgG subclasses of human autoantibodies Annais. Medicine. Interne, **148**, 29-38, 1997.

MARGEL S. e MARCUS L. Model systems employing affinity chromatography for extraction of toxic substances directly from whole blood. Molecular Interactions in Bioseparations, Ed. That T. Ngo. Plenum Press, Nova York, 1993.

MINOBE, S.; WATANABE, T.; SATO, T. e TOSA, T. Characteristics and Applications of Adsorbents for Pirogen Removal. Biotechnology and Applied Biochemistry, **10**, 143-153, 1988.

MUROI, K.; SASAKI, R. e MIURA, Y. The effect of Immunoadsorption Therapy by a Protein A Column on Patients with Thrombocytopenia. Seminars in Hematology, **26**, (2), suppl. 1, 10-14, 1989.

NAPARSTEK, Y. The role of autoantibodies in autoimmune disease. Ann. Rev. Immunol., **11**, (79), 1993 *apud* FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.

PALMER, A.; CAIRNS, T.; DISCHE, F.; GLUCK, G.; GJORRSTRUP, P.; PARSONS, V.; WELSH, K. e TAUBE, D. Treatment of Rapdily Progressive Glomerulonephritis by Extracorporeal Immunoadsorption, Prednisolone and Cyclophosphamide. Nephrology Dialysis Transplantation, **6**, 536-542, 1991.

REVILLARD, J.P. Imunologie, Dee Boeck-Wesmael S.A., Bruxelas, 1994.

RICHTER, W.O; DONNER, M.G.; SELAMIER, A.; HILLER, E. e SCHAWANDT, P. Efficacy and safety of immunoglobulin apheresis. ASAIO JOURNAL, **43**, 53-59, 1997.

ROITT, I.M. BROSTOFF, J.; MALE, D. Immunology. Churchill Livingstone, Londres, 1987.

SCHNEIDER, M.; BERNING, T.; WALDENDORF, M.; GLASER, J. e GERLACH, U. Immunoadsorbent Plasma Perfusion in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. The Journal of Rheumatology, **17**, 900-907, 1990.

SCHENEIDER, K.M., Plasmapheresis and immunoadsorption: Different techniques and their current role in medical therapy. Kidney International, **53**, suppl. 64, S-61-S-65, 1998.

SNYDER, H.W.; COCHRAN, S.K.; BALINT, J.P.; BERTRAM, J.H.; MITTELMAN, A., GUTHRIE, T.H. e JONES, F.R. Experience with Protein A-Immunoadsorption in Treatment-Resistant Adult Immune Thrombocytopenic Purpura. Blood, **79**, 2237-2245, 1992.

SNYDER, H.W.; MITTELMAN, A.; ORAL, A.; MESSERSCHMIDT, G. L.; HENRY, D. H.; KOREC, S.; BERTRAM, J.H.; GUTHRIE, T. H.; CIAVARELLA, D.; WUEST, D.; PERKINS, W.; BALINT, J. P.; COCHRAN, S. K.; PEUGEOT, R. L. e JONES, F.R. Treatment of Cancer Chemotherapy - Associated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura/Hemolytic Uremic Syndrome by Protein A Immunoadsorption of Plasma. Cancer, **71**, 1993.

TERMAN, D.S.; PETTY, D.; HARBECK, R.; CARR, R.I. e BUFFALOE, G. Specific removal of DNA antibodies in vivo by extracorporeal circulation over DNA immobilized in collodion charcoal. Clinical Immunology and Immunopathology, **8**, 90-96, 1977.

TERMAN, D.S.; BUFFALOE, G.; MATTIOLI, C.; COOK, G.; TILLQUIST, R.; SULLIVAN, M. e AYUS, J.C. Extracorporeal Immunoadsorption: initial experience in human systemic lupus erythematosus. The Lancet, outubro, 824-827, 1979.

THÖMES, J. e KULA, M.R. Membrane Chromatography – An Integrative Concept in the Downstream Processing of Proteins. Biotechnology Progress, **11**, 357-367, 1995.

VIJAYALAKSHMI, M.A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. Trends in Biotechnology, **7**, 1989.

VLUG, A. e REMORTEL, V. The structure and function of human IgG subclasses American Clinical Laboratory, 1989.

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

ANEXO

Comparação do sistema de afinidade His-PEVA com a literatura

Para uma concentração de anti-dsDNA no plasma do paciente de 50 IU/ml, realizando-se o tratamento de 2 litros de plasma em três sessões extracorpóreas tem-se os seguintes cálculos:

C = 50 IU/ml :

Em 2 litros ou 2.000 ml de plasma há 100.000 IU de anti-dsDNA antes do tratamento

(50 IU/ml) x (2.000 ml) = 100.000 IU

His-PEVA

- Capacidade de adsorção de anti-dsDNA (Ca), refente a C = 50 IU/ml, é de = 0,5 IU/cm^2.
- A área ocupada pelas membranas (50,3 cm^2) corresponde a um volume de 0,11 cm^3, portanto para um módulo contendo membranas His-PEVA com área de 2 m^2 (20.000 cm^2) o volume ocupado pelas membranas (V) seria de 44 ml:

$$V = \frac{(0{,}11)(20.000)}{50{,}3} = 44ml \qquad \text{Equação 1}$$

Tabela 1 – Representação da simulação de um tratamento extracorpóreo *in vivo* utilizando-se His-PEVA para a remoção do auto-anticorpo anti-dsDNA.

Sessões extracorpóreas	Quantidade de anti-dsDNA inicial (IU)	Unidades Adsorvidas (IU)	Quantidade de anti-dsDNA remanescente (IU)
1ª	100.000 IU	30.000 IU	70.000 IU
2ª	70.000 IU	30.000 IU	40.000 IU
3ª	40.000 IU	30.000 IU	10.000 IU

Ilustração do cálculo realizado:

- 1ª sessão de tratamento extracorpóreo

inicial = 100.000 IU

Ca = 0,5 IU/cm^2

Área = 20.000 cm^2

Cálculo das unidades adsorvidas (X) em 1 hora de recirculação :

$$X = (0{,}5)(20.000) = 10.000 IU \qquad \text{Equação 2}$$

Supondo-se a utilização de 3 colunas em cada sessão extracorpórea, sendo cada uma delas utilizada em 1 hora da sessão, no final de 3 horas (duração da sessão do tratamento extracorpóreo) haveriam 30.000 IU adsorvidas.

Quantidade de anti-dsDNA remanescente:

100.000 IU (iniciais) – 30.000 IU (adsorvidas) = 70.000 IU

- A quantidade de auto-anticorpo adsorvida por volume de membrana =

$$\frac{(N)(UA)}{(C)(V)} = 682\,\frac{IU}{ml} \qquad \text{Equação 3}$$

onde:

N = n° de sessões extracorpóreas (3);
UA = unidades adsorvidas em cada sessão extracorpórea (30.000 IU);
C = n° de cartuchos His-PEVA (3);
V = volume das membranas (44 ml);

***Phe*-PVA**

Volume do gel de PVA = 300 ml

inicial = 100.000 IU

Quantidade de anti-dsDNA removida em 3 sessões de tratamento extracorpóreo = 80.000 IU

Quantidade de anti-dsDNA remanescente = 100.000 IU - 80.000 IU = 20.000 IU

- A quantidade de auto-anticorpo adsorvida por volume de gel =

$$\frac{80.000}{300} = 267\,\frac{IU}{ml}$$