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

PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G A PARTIR DO PLASMA OU SORO HUMANO UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE COM ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS

Engª Sandra Vançan
Aluna de Mestrado

Profª Drª Sônia Maria Alves Bueno
Orientadora

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

Outubro de 1999

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
V277p
V. Ex.
TOMBO BC/40384
PROC. 278/2000
C D
PREÇO R$ 11,00
DATA 16-02-2000
N.º CPD

CM-00138040-9

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

Vançan, Sandra
V277p Purificação de imunoglobulina G a partir do plasma ou soro humano utilizando cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados / Sandra Vançan.-- Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientadora: Sônia Maria Alves Bueno
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Purificação. 2. Cromatografia de afinidade. 3. Imunoglobulina G. I. Bueno, Sônia Maria Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G A PARTIR DO PLASMA OU SORO HUMANO UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE COM ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS

Autora: Engª Sandra Vançan
Orientadora: Profª Drª Sônia Maria Alves Bueno

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

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana
Universidade Estadual de Campinas - FEQ

Prof. Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa
Ralston International do Brasil Ltda

Campinas, 27 de outubro de 1999.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Sandra Vançan e aprovada pela Comissão Julgadora em 27 de outubro de 1999.

Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno

Aos meus pais, Valdir e Neusa.

AGRADECIMENTOS

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

À Deus, por tudo.

Aos meus pais e aos meus dois irmãos, pelo apoio e carinho.

À Profª Drª Sônia Maria Alves Bueno, pela orientação.

Aos amigos do laboratório da FEQ, pelos momentos bons proporcionados: Roberta, Fábio, Luciana, Marcelo Viegas, José Antônio, Eduardo, Adriano, Denise, Ana, Líbia, Marisa, Oselys, Rosana, Sérgio, Victor, Vinícius, Rodrigo, Priscila, César e Elcimar.

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

Ao apoio financeiro da FAPESP.

SUMÁRIO

RESUMO i

ABSTRACT ii

CAPÍTULO1:
INTRODUÇÃO 1

1.1. RELEVÂNCIA DA IgG 1

1.2. OBJETIVO 3

CAPÍTULO 2:
REVISÃO BIBBLIOGRÁFICA 4

2.1. IMUNOGLOBULINAS 4

2.1.1. Imunoglobulinas G 8

2.1.2. Subclasses de IgG 8

2.2. MÉTODOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE IgG A PARTIR DO SORO OU PLASMA HUMANO 10

2.2.1. *Separação de IgG baseada na diferença de solubilidade* 11

2.2.2. *Separação de IgG baseada na diferença de tamanho da molécula* 12

2.2.3 Separação de IgG baseada na adsorção seletiva 12

2.3. IMAC 17

2.3.1. Agente quelante 19

2.3.2. Íons metálicos selecionados 21

2.3.3. Seleção da matriz 23

2.3.4. Escolha dos sistemas tamponantes 23

2.3.5. Condições de adsorção 24

2.3.6. Condições de eluição 25

CAPÍTULO 3:
MATERIAIS E MÉTODOS 27

3.1. MATERIAIS 27

3.2. MÉTODOS 28

3.2.1. Quantificação de proteínas 28

3.2.2. Imobilização de ácido iminodiacético 28

3.2.3. Cromatografia em coluna com gel IDA-Me^{2+} 29

3.2.4. Ensaio cromatográfico usando duas colunas cromatográficas.....31
3.2.5. Verificação do desprendimento de metal da coluna.....31
3.2.6. Ultrafiltração.....32
3.2.7. Eletroforese SDS-PAGE.....32
3.2.8. Focalização Isoelétrica.....33
3.2.9. Imunodifusão radial.....34
3.2.10. Nefelometria.....34

CAPÍTULO 4:
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....35
4.1. ENSAIOS PRELIMINARES.....35
4.1.1. Verificação do desprendimento do metal na coluna.....36
4.2. INFLUÊNCIA DOS TAMPÕES E DOS ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS NA ADSORÇÃO DE IgG.....37
4.2.1. Sistema tamponante MMA.....37
4.2.2. Sistema tamponante Fosfato e Acetato.....39
4.2.3. Sistema tamponante Mops contendo imidazol.....42
4.2.4. Íon Co^{2+}: Solução tamponante Tris-HCl e Mops contendo imidazol.....44
4.3. ANÁLISE DOS RESULTADOS DAS CROMATOGRAFIAS UTILIZANDO IgG PURA.....46
4. INFLUÊNCIA DA SOLUÇÃO TAMPONANTE NA ADSORÇÃO DE IgG A PARTIR DO PLASMA HUMANO.....48
4.5. INFLUÊNCIA DOS ÍONS METÁLICOS Cu^{2+}, Co^{2+} e Zn^{2+} NA ADSORÇÃO DE IgG A PARTIR DO PLASMA HUMANO.....54
4.6. SEPARAÇÃO DE IgG A PARTIR DO SORO HUMANO UTILIZANDO COLUNAS EM SÉRIE COM ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS.....59
4.6.1 Influência dos íons metálicos imobilizados e tampão Mops contendo imidazol na separação de IgG a partir do soro humano.....59
4.6.2 Influência dos íons metálicos imobilizados e tampão Fosfato e Acetato na separação de IgG a partir do soro humano.....65
4.7. DISTRIBUIÇÃO DE PONTO ISOELÉTRICO DAS FRAÇÕES RETIDAS E NÃO RETIDAS DE IgG.....69

CAPÍTULO 5:
CONCLUSÃO.....72
5.1. CONCLUSÃO.....72
5.2. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....73

CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....75

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura do anticorpo (imunoglobulina)

Figura 2.2: Esquema dos métodos utilizados para purificação de IgG.

Figura 2.3: Esquema dos ligantes utilizados em cromatografia de afinidade (adaptado de VIJAYALAKSHMI, 1989).

Figura 2.4: O metal hexacoordenado pode ter um simples a) ou múltiplo b) sítio de adsorção dependendo do agente quelante utilizado. a) agente quelante: tris-carboximetil etileno diamina (TED); b) ácido iminodiacético (IDA).

Figura 2.5: Estrutura do suporte cromatográfico utilizado em IMAC, IDA-Sepharose.

Figura 3.1: Esquema do equipamento cromatográfico. (1) Solução de alimentação; (2) Bomba peristáltica; (3) Coluna cromatográfica; (4) Detector UV, (5) Sistema de aquisição de dados; (6) Coletor de frações.

Figura 4.1: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Cu^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampões MMA 50 mM contendo 1M NaCl a pH 7,0; 6,0; 5,0 e 4,0.

Figura 4.2: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Ni^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampões MMA 50 mM contendo 1M NaCl a pH 7,0; 6,0; 5,0 e 4,0.

Figura 4.3: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Zn^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampões MMA 50 mM contendo 1M NaCl a pH 7,0; 6,0; 5,0 e 4,0.

Figura 4.4: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Cu^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampões Fosfato 50 mM contendo 1M NaCl a pH 7,0 e 6,0, e Acetato 0,1M a pH 5,0 e 4,0.

Figura 4.5: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Ni^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampões Fosfato 50 mM contendo 1M NaCl a pH 7,0 e 6,0, e Acetato 0,1M a pH 5,0 e 4,0.

Figura 4.6: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Zn^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampões Fosfato 50 mM contendo 1M NaCl a pH 7,0 e 6,0, e Acetato 0,1M a pH 5,0 e 4,0.

Figura 4.7: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Cu^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampões Mops contendo 1 M NaCl e 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol a pH 7.

Figura 4.8: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-6B com o íon Ni^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampões Mops contendo 1 M NaCl e 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol a pH 7.

Figura 4.9: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Zn^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampões Mops contendo 1 M NaCl e 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol a pH 7.

Figura 4.10: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Co^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampões Tris-HCl 25, 50, 100, 150 e 200 mM a pH 7.

Figura 4.11: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Co^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampões Mops contendo 1 M NaCl e 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol a pH 7.

Figura 4.12: Cromatografia de IgG purificada a partir do plasma humano em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Ni^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampões 50 mM de MMA contendo 1M NaCl a pH 7,0; 6,0; 5,0 e 4,0.

Figura 4.13: Cromatografia de IgG purificada a partir do plasma humano em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Ni^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampões Fosfato 50 mM contendo 1M NaCl a pH 7,0 e 6,0, e Acetato 0,1M a pH 5,0 e 4,0.

Figura 4.14: Cromatografia de IgG purificada a partir do plasma humano pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Ni^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampões Mops contendo 1 M NaCl e 2mM, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol a pH 7.

Figura 4.15: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com coomassie brilliant blue. Tempo de migração aproximadamente 7 horas. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando o íon metálico Ni^{2+}, e tampão MMA 0,05M contendo 1 M de NaCl (pH 7, 6, 5 e 4).

Figura 4.16: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com coomassie brilliant blue. Tempo de migração aproximadamente 7 horas. Amostras em

condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando o íon metálico Ni^{2+}, e tampões Fosfato (pH 7 e 6) e Acetato (pH 5 e 4) ambos contendo 1 M de NaCl.

Figura 4.17: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com coomassie brilliant blue. Tempo de migração aproximadamente 7 horas. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando o íon metálico Ni^{2+}, e tampões Mops contendo 1 M de NaCl e 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol a pH 7.

Figura 4.18: Cromatografia de IgG purificada a partir do plasma humano em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Cu^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampões Mops contendo 1 M NaCl e 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol a pH 7.

Figura 4.19: Cromatografia de IgG purificada a partir do plasma humano em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Co^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampões Mops contendo 1 M NaCl e 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol a pH 7.

Figura 4.20: Cromatografia de IgG purificada a partir do plasma humano em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Zn^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampões Mops contendo 1 M NaCl e 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol a pH 7.

Figura 4.21: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com coomassie brilliant blue. Tempo de migração aproximadamente 7 horas. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando o íon metálico Cu^{2+}, e tampões Mops contendo 1 M de NaCl e 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol a pH 7.

Figura 4.22: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com coomassie brilliant blue. Tempo de migração aproximadamente 7 horas. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando o íon metálico Co^{2+}, e tampões Mops contendo 1 M de NaCl e 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol a pH 7.

Figura 4.23: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com coomassie brilliant blue. Tempo de migração aproximadamente 7 horas. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando o íon metálico Zn^{2+}, e tampões Mops contendo 1 M de NaCl e 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol a pH 7.

Figura 4.24: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com nitrato de prata. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando os íons metálicos Zn^{2+} (*) e Ni^{2+}, e tampões Fosfato 0,05 M (pH 7), Acetato 0,1 M (pH 4) e Mops contendo 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol, todos com 1M de NaCl.

Figura 4.25: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com nitrato de prata. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando os íons metálicos Zn^{2+} (*) e Co^{2+}, e tampões Fosfato 0,05 M (pH 7), Acetato 0,1 M (pH 4) e Mops contendo 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol, todos com 1M de NaCl.

Figura 4.26: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com nitrato de prata. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando os íons metálicos Zn^{2+} (*) e Cu^{2+}, e tampões Fosfato 0,05 M (pH 7), Acetato 0,1 M (pH 4) e Mops contendo 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol, todos com 1M de NaCl.

Figura 4.27: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com nitrato de prata. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando os íons metálicos Zn^{2+} (*) e Ni^{2+}, e tampões Fosfato 0,05 M (pH 7 e 6) e Acetato 0,1 M (pH 5 e 4) ambos contêm 1M de NaCl.

Figura 4.28: Lâmina (gel de agarose 1%), contendo no orifício inferior a fração eluída com tampão Acetato a pH 5, e nos orifícios superiores e laterais (esquerda e direita) os respectivos anti-soros humano: IgG, IgM e IgA.

Figura 4.29: Gel de eletroforese IEF, gradiente 3 a 9 (Phast gel). Revelação com nitrato de prata. Amostras obtidas a partir da cromatografia utilizando o íon metálico Ni^{2+}, e tampões Fosfato 0,05 M (pH 7 e 6) e Acetato 0,1 M (pH 5) ambos contendo 1M de NaCl.

Figura 4.30: Gel de eletroforese IEF, gradiente 3 a 9 (Phast gel). Revelação com nitrato de prata. Amostras obtidas a partir da cromatografia utilizando os íons metálicos Ni^{2+}, e tampões Mops contendo 2, 10, 20, 30 e 50 mM de imidazol com 1M de NaCl.

Figura 4.31: Gel de eletroforese IEF, gradiente 3 a 9 (Phast gel). Revelação com nitrato de prata. Amostras obtidas a partir da cromatografia utilizando os íons metálicos Zn^{2+}, e tampões Mops contendo 2, 10, 20, 30 e 50 mM de imidazol com 1M de NaCl.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: **Propriedades físico-químicas das imunoglobulinas** (Tabela Modificada- CALICH e VAZ, 1989).

Tabela 2: **Propriedades físico-químicas das subclasses de IgG humana** (Tabela Modificada- VLUG e VAN REMOTEL, 1989).

Tabela 3: **Exemplos de proteínas purificadas utilizando IMAC.**

Tabela 4: **Reconhecimento dos resíduos histidina por IDA-Me^{2+} ***

Tabela 5: **Ensaios de adsorção e de dessorção de IgG utilizando tampão MMA.**

Tabela 6: **Ensaios de adsorção e de dessorção de IgG utilizando tampões Fosfato e Acetato, respectivamente.**

Tabela 7: **Ensaios de adsorção e de dessorção de IgG utilizando tampão Mops contendo imidazol.**

Tabela 8: **Ensaio de adsorção e de dessorção de IgG utilizando tampão Tris-HCl.**

Tabela 9: **Ensaio de adsorção e de dessorção de IgG utilizando tampão Mops contendo imidazol.**

Tabela 10: **Balanço de massa das poteínas totais do plasma humano, após a cromatografia, com dessorção por gradiente decrescente de pH.**

Tabela 11: **Balanço de massa das poteínas totais do plasma humano, após a cromatografia, com dessorção por gradiente crescente da concentração de imidazol.**

Tabela 12: **Balanço de massa das proteínas do plasma humano, após a cromatografia em matrizes IDA-Cu^{2+}, -Co^{2+} e -Zn^{2+}.**

Tabela 13 a: **Ensaios de adsorção e dessorção de proteínas do soro utilizando coluna IDA-Zn^{2+} (1^{a} coluna).**

Tabela 13 b: **Ensaios de adsorção e dessorção de proteínas do soro utilizando coluna IDA-Ni^{2+} e tampão Mops contendo imidazol a pH 7 (2^{a} coluna).**

Tabela 14 a: **Ensaios de adsorção e dessorção de proteínas do soro utilizando coluna IDA-Zn^{2+} (1^{a} coluna).**

Tabela 14 b: **Ensaios de adsorção e dessorção de proteínas do soro utilizando coluna IDA-Co^{2+} e tampão Mops contendo imidazol a pH 7 (2^{a} coluna).**

Tabela 15 a: **Ensaios de adsorção e dessorção de proteínas do soro utilizando coluna IDA-Zn^{2+} (1^{a} coluna).**

Tabela 15 b: **Ensaios de adsorção e dessorção de proteínas do soro utilizando coluna IDA-Cu^{2+} e tampão Mops contendo imidazol a pH 7 (2^{a} coluna).**

Tabela 16 a: **Ensaios de adsorção e dessorção de proteínas do soro utilizando coluna IDA-Zn^{2+} (1^{a} coluna).**

Tabela 16 b: **Ensaios de adsorção e dessorção de proteínas do soro utilizando coluna IDA-Ni^{2+} (2^{a} coluna).**

ABREVIATURAS

IMAC: Cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados

Ig: Imunoglobulina

Fc: Fragment crystaline

Fab: Fragment antigen binding

Me^{2+}: íon metálico

Cu^{2+}: íon metálico cobre

Ni^{2+}: íon metálico níquel

Co^{2+}: íon metálico cobalto

Ca^{2+}: íon metálico cálcio

Mg^{2+}: íon metálico magnésio

Al^{3+}: íon metálico alumínio

Fe^{3+}: íon metálico ferro

IEF: Isoeletric Focusing

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulphate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis

EDTA: Ácido etilenodiamino tetraácido

IDA: Ácido iminodiacético

TED: Tris-carboximetil etileno diamina

TREN: Tris (2-aminoetil) amina

NTA: Ácido nitrilo triacético

TEPA: Tetraetilenopentamina

CM-DASA: Ácido carboximetil α, β diamino succínico

CM-Asp: Ácido carboximetil aspártico

MMA: Mes, Mops e Acetato

Da: Dalton

g: Aceleração da gravidade

pK: -log[Ka]

Ka: Constante de equilíbrio

pH: - log $[H^+]$

pI: Ponto isoelétrico

Resumo

Atualmente, a purificação de proteínas do plasma utilizando métodos seletivos (cromatográficos) tem sido visto pela indústria farmacêutica como uma operação necessária, uma vez que proteínas altamente purificadas limitam os riscos de efeitos colaterais em pacientes. Por isso, o desenvolvimento de métodos seletivos de purificação em larga escala são hoje indispensáveis para aumentar a diversidade, melhorar o rendimento e o grau de pureza das proteínas terapêuticas extraídas do plasma. No presente trabalho estuda-se a viabilidade de separar imunoglobulina G (IgG) a partir do plasma humano utilizando cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados, IMAC. Esta técnica explora a afinidade de proteínas por íons metálicos imobilizados e tem sido utilizada para purificar várias proteínas e peptídeos.

Experimentos cromatográficos foram realizados com IgG humana pura para selecionar o íon metálico entre Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} e Co^{2+}, a ser imobilizado no agente quelante (IDA) e vários tampões foram testados na etapa de adsorção. As proteínas adsorvidas no suporte foram eluídas pela protonação dos grupos doadores de elétrons da proteína reduzindo-se o pH do meio ou por competição com outra espécie doadora de elétrons (gradiente crescente da concentração de imidazol).

Estes íons metálicos imobilizados no agente quelante IDA apresentaram diferentes forças de retenção da proteína (IgG humana pura). Selecionado o íon metálico Ni^{2+}, a seletividade do suporte em adsorver IgG foi determinada empregando plasma humano de indivíduos sadios. Como IgG não foi purificada em IDA-Ni^{2+} a níveis expressivos, utilizou-se uma segunda coluna em série com a primeira, a fim de obter maior pureza de IgG. Análises nefelométricas da fração retida em colunas IDA-Zn^{2+} em série com IDA-Ni^{2+} e eluída a pH 5,0 mostraram a presença de 41,90% de IgG, 1,34% de IgM, 2,10% de IgA e 54,69% de transferrina. As proteínas contaminantes, transferrina e IgM, podem ser removidas da amostra por cromatografia de filtração em gel.

A análise realizada por focalização isoelétrica das frações de lavagem e de eluição dos experimentos conduzidos com IgG humana Sigma, mostrou que a distribuição de pontos isoelétricos nas frações de lavagem e eluição não dependeu do íon metálico imobilizado (dentre os estudados), nem do sistema tamponante utilizado. Observou-se que as frações não retidas (lavagem) apresentaram IgG de baixo pI (entre 5,0 e 6,0). Não obteve-se seletividade na eluição de IgG por decréscimo de pH (íons Ni^{2+} imobilizado) ou incrementos na concentração de imidazol (íons Ni^{2+} e Zn^{2+} imobilizados), todas as frações apresentaram pI de 6,0 a 8,65, não sendo observado a separação.

Abstract

Purification of plasma proteins through selective methods, such as cromatography, has been recognised in nowadays as an important operation by pharmaceutical industry as the highly purified proteins reduce side effects. Therefore, the development of purificaton selective methods for large scale operations are extremely important to broad diversity, improve the yield and purity of therapeutic proteins extracted from plasma. In this work a flexibility study on the separation of immunoglobulin G (IgG) from human plasma through immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) is carried out. This technique exploit the protein affinity for immobilized metal ion and has been used to purity several proteins and peptides.

Chromatography were carried out with pure human IgG in order to select the metal ion amongst Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} e Co^{2+}, to be immobilized on IDA. Several buffers were tested in the adsorption stage as well. The proteins adsorbed on the support were eluted by the protonation of the electron-donating species on the protein using a decreasing pH step gradient or increasing imidazole concentration.

The metal ion bonding chelating agents (IDA) showed distinct interactions with protein (pure human IgG). Since Ni^{2+} was selected, the support selectivity to adsorb IgG was determined with human plasma from healthy people. As IgG has not been completely purified on IDA-Ni^{2+}, a second column (containing immobilized Ni^{2+}) has been used in series with the first one (containing immobilized Zn^{2+}) in order to achieve a ligher purity degree of IgG. Nephelometric analysis of the retained fraction on IDA-Zn^{2+} columns in series with IDA- Ni^{2+}, and eluted at pH 5.0 determinated 41.90% of IgG, 1.34% of IgM, 2.10% of IgA and 54.69% of transferrin. The contaminant proteins (transferrin and IgM) could be removed using gel filtration.

The analysis carried out by isoelectric focusing of wash e elution fractions using human IgG (Sigma), showed that the isoelectric point distribution in the wash and elution fractions were not dependent neither on the immobilized metal ion or the buffer used. It could be observed that the non-retained fractions (wash) contained IgG with low pI (between 5.0 e 6.0). Selectivity in IgG elution by decreasing pH step gradient (immobilized Ni^{2+}) or increasing imidazole concentration (immobilized Ni^{2+} and Zn^{2+}) was not reached; all retained fractions contained IgG with pI between 6.0 and 8.65, and separation was not observed.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. RELEVÂNCIA DA IgG

Cerca de 17 milhões de litros de plasma humano são coletados por ano no mundo para fracionamento. Apesar disso, essa quantidade não é suficiente para suprir as necessidades de proteínas terapêuticas provenientes do plasma, especialmente de albumina, usada, por exemplo, como fluido de substituição e reposição em tratamento extracorpóreo (cerca de 300 toneladas, anuais), de fator VIII de coagulação sangüínea, utilizado no tratamento de hemofílicos (cerca de 1kg, anuais) e de imunoglobulina G (cerca de 10 toneladas, anuais) [BURNOUF, 1995].

No que diz respeito à um tipo específico de imunoglobulina, imunoglobulina G (IgG), as prescrições terapêuticas intravenosas são indicadas nos seguintes casos [BERNARD et al., 1990]:

a) imunodeficiências congênitas ou adquiridas, onde o paciente pode apresentar deficiência global ou de algumas subclasses de IgG;

b) tratamento de deficiência seletivas de anticorpos, como no caso de inflamações crônicas, no qual a produção de anticorpos é insuficiente para combater a doença;

c) tratamento de doenças auto-imunes, como por exemplo a Púrpura trombocitopênica idiopática. Nesse caso, a injeção intravenosa de imunoglobulina G eleva em poucas horas o nível de plaquetas e essa elevação está relacionada à diminuição de auto-anticorpos anti-plaquetas;

d) tratamento de alguns tipos de câncer (ex. leucemia linfocítica crônica).

As doenças acima citadas requerem, geralmente, grandes doses de IgG para o seu tratamento, doses essas que podem chegar a várias gramas por paciente por ano [BERNARD et al., 1990]. Como as imunoglobulinas G estão presentes no plasma a uma concentração de 8 a 11 mg/ ml, para obter-se 1 grama de IgG, seria necessário fracionar cerca de 100 ml de plasma, o que pode representar para as indústrias farmacêuticas o processamento de centenas de litros de plasma por dia para atender a população necessitada.

A maioria das indústrias farmacêuticas obtém IgG a partir do plasma de doadores sadios, precipitando pelo método de Cohn utilizando etanol como agente de partição, seguido por tratamento com mistura solvente-detergente e incubação a pH 4,0, obtendo-se IgG ligeiramente contaminada com albumina (normalmente 0,5%) e com outras proteínas que se encontram presentes no plasma em menores concentrações. Atualmente, a purificação de proteínas do plasma utilizando métodos mais seletivos (cromatográficos) tem sido vista pela indústria farmacêutica como uma operação indispensável antes da utilização dessas proteínas no campo terapêutico, uma vez que proteínas altamente purificadas limitam os riscos de efeitos colaterais em pacientes [BURNOUF, 1995]. Por isso, o desenvolvimento de métodos seletivos de purificação em larga escala são hoje indispensáveis para aumentar a diversidade, melhorar o rendimento e o grau de pureza das proteínas terapêuticas extraídas do plasma.

Dentre as técnicas cromatográficas empregadas para a purificação de IgG, a cromatografia de afinidade utilizando proteína A como ligante é a mais popular. No entanto, a utilização deste método não é atrativo devido a seu custo elevado, a toxicidade em caso de desprendimento do ligante da matriz sólida, a perda de atividade biológica do ligante no decorrer do tempo de utilização e a possibilidade de uma contaminação bacteriana. Como alternativa a este método, estudou-se neste trabalho a utilização de íons metálicos imobilizados para purificação de IgG, devido a atratividade dessa técnica em termos econômicos e operacionais, uma vez que estes ligantes são moléculas simples, estáveis, de baixo custo e fácil imobilização.

1.2. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um processo de purificação de IgG a partir do plasma ou soro humano utilizando a técnica de cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados – IMAC (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography).

Em IMAC, o princípio da separação baseia-se na adsorção da proteína de interesse em íons metálicos imobilizados numa matriz sólida. Esta adsorção ocorre através da formação de ligações de coordenação entre resíduos de aminoácidos histidina, cisteína e triptofano acessíveis na superfície da proteína com os íons metálicos imobilizados.

O que motivou o emprego de IMAC para a purificação de IgG foi a existência de trabalhos realizados por vários pesquisadores [PORATH e OLIN, 1983; HALE e BEIDLER, 1994; BODEN et al., 1995; VÁZQUEZ-MORENO e PLATA, 1996] mostrando a possibilidade de adsorver IgG proveniente de diversas fontes em géis contendo íons Ni^{2+} e Cu^{2+} imobilizados.

As etapas propostas para a realização desse trabalho foram as seguintes:

i – Estudar a influência dos íons metálicos Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} e Co^{2+} e dos sistemas tamponantes MMA (Mes, Mops e Acetato), Fosfato-Acetato e Mops-Imidazol na adsorção e dessorção de IgG humana;

ii – Investigar condições (tipo de íon metálico imobilizado e sistema tamponante) para a separação de IgG a partir do plasma humano;

iii – De modo a complementar o itém ii, propôs-se investigar a possibilidade de reduzir o número de contaminantes nas frações de IgG adsorvidas utilizando-se duas colunas em série com diferentes íons metálicos imobilizados;

iv – Determinar a distribuição de pontos isoelétricos de IgG nas frações retidas e não retidas em Zn^{2+} e Ni^{2+} imobilizados.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão ressaltados três aspectos importantes sobre os assuntos que envolvem este trabalho: imunoglobulinas, métodos mais utilizados para purificação de imunoglobulina G (IgG ou γG) e IMAC.

2.1. Imunoglobulinas

O teor total de proteínas no plasma é de aproximadamente 72 a 75 mg/ml. A primeira proteína mais abundante é a albumina (40 mg/ml), cerca de 55% no plasma, sendo o maior contribuinte a pressão colóide osmótica intravascular. A segunda proteína mais abundante é as globulinas, dentre as globulinas temos as imunoglobulinas G (8 a 11 mg/ml), cerca de 11% no plasma, que são úteis contra algumas doenças como caxumba, sarampo e rubéola [MURRAY et al., 1990].

Dentre estas proteínas presentes no plasma iremos estudar em particular as imunoglobulinas, que são produzidas pela indução de substância estranha ao organismo normal (antígeno). Os anticorpos (imunoglobulinas) representam uma das principais defesas do organismo contra os agentes infecciosos.

As imunoglobulinas não estão somente presentes no plasma, mas também no baço,

medula óssea, timo e tecidos linfóides associados às mucosas das vias gastrointestinais e respiratórias [MURRAY et al., 1990]. As imunoglobulinas são glicoproteínas compostas de 82 a 96% de polipeptídios e 4 a 18% de carboidratos. O componente polipeptídico desempenha quase todas as propriedades biológicas associadas às moléculas de anticorpo. As imunoglobulinas apresentam duas cadeias polipeptídicas pesadas e duas leves interligadas formando um tetrâmero através de ligações dissulfetos, como mostra a Figura 2.1. As duas cadeias polipeptídicas leves apresentam massa molecular de aproximadamente 23 kDa e as cadeias polipeptídicas pesadas apresentam massa molecular variável entre 50 kDa e 75 kDa, dependendo da classe a que pertence o anticorpo [CALICH e VAZ, 1989].

As imunoglobulinas podem ser divididas em classes de acordo com os tipos de cadeias leves e pesadas que contêm. No homem são conhecidas cinco classes diferentes de imunoglobulinas, cada qual possuindo uma estrutura química distinta e um papel biológico específico. Estas classes são designadas pelas letras G, A, M, D e E, que se seguem à abreviação Ig (que indica a sua função de imunoglobulina). As regiões constantes das cadeias pesadas diferem de uma classe para outra, enquanto as de cadeias leves são idênticas. As cadeias pesadas de imunoglobulina G são chamadas cadeias γ (gama), enquanto as das imunoglobulinas A, M, D e E são chamadas α (alfa), μ (mi), δ (delta) e ε (épsilon), respectivamente [LEHNINGER, 1986].

As sequências de aminoácidos ao longo das cadeias são constantes entre os anticorpos, exceto pelas sequências curtas das porções em oposição das cadeias pesadas e leves (representado na Figura 2.1 pelas porções cinzas). Estas sequências são únicas para cada um dos anticorpos produzidos pelo indivíduo e constituem o sítio de ligação para o seu antígeno específico. O grau elevado de especificidade de um sítio do anticorpo por um antígeno depende de dois fatores: sua forma é complementar ao do antígeno e as cadeias no interior dos sítios estão posicionadas para maximizar as forças eletrostáticas, forças de van der Waals e ligações de hidrogênio entre os anticorpos e os antígenos [VANDER, 1981].

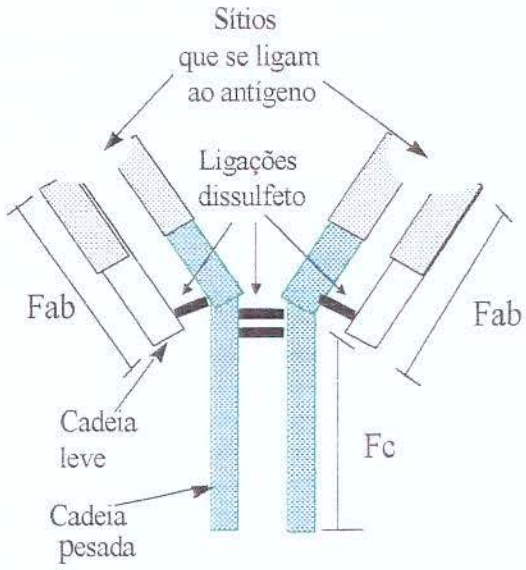

Figura 2.1: Estrutura do anticorpo (imunoglobulina)

A imunoglobulina G (IgG) é a mais abundante dos anticorpos plasmáticos (aproximadamente 75% em adulto). IgM constitui aproximadamente 10% das imunoglobulinas séricas, além de ser a maior das moléculas de imunoglobulina, por causa do seu tamanho, está restrita quase inteiramente ao espaço intravascular, tendo como função suprir a parte da imunidade específica contra bactérias e vírus. IgE é uma imunoglobulina presente apenas em quantidades mínimas no soro, cerca de 0,004% do total das imunoglobulinas séricas, seu mecanismo de ação envolve as doenças alérgicas, pois apresenta a função de ligar-se ao alérgeno. IgA é a segunda imunoglobulina sérica mais abundante, cerca de 15%, sendo a principal classe de anticorpos nas secreções externas, tais como saliva, as lágrimas, o muco bronquial e o muco intestinal. Quanto à quinta classe de imunoglobulina, IgD, esta presente no soro em quantidades pequenas (cerca de 0,2% do total das imunoglobulinas séricas), seus benefícios ainda não são conhecidos [BELLANTI, 1985 e LEHNINGER, 1986]. Algumas propriedades físico-químicas das classes de imunoglobulinas humanas são representadas na Tabela 1.

Tabela 1: **Propriedades físico-químicas das imunoglobulinas** (Tabela Modificada-CALICH e VAZ, 1989).

Classe	Concentração no soro (adulto) [mg/ml]	Massa molar (kDa)	Número de subclasses	Teor de carboidratos (%)
IgG	8 – 11	150	4	2 – 3
IgA	1 – 4	160* 400**	2	8
IgM	0,05 – 2	900	2	12
IgD	0 – 0,17	180	1	13
IgE	$(0,15 - 0,35)10^{-3}$	190	1	12

* Para IgA monomérica no soro;
** Para IgA de secreções

Para estudar a estrutura das imunoglobulinas é necessário uma clivagem enzimática da molécula de imunoglobulina obtendo-se assim porções que se convencionou denominar fragmentos. Os fragmentos obtidos pela ação de enzimas proteolíticas possuem propriedades químicas e imunológicas que os caracterizam [CALICH e VAZ, 1989].

A molécula de imunoglobulina possui dois fragmentos denominados Fc e Fab. O fragmento Fab apresenta sítios combinantes, que conferem ao anticorpo sua propriedade de unir-se em forma bivalente ao antígeno. O fragmento Fc não tem atividade de anticorpo (não se liga ao antígeno) mas possui propriedades químicas que lhe permitem desempenhar importantes funções biológicas que variam para cada classe de Ig, como: fixação do complemento e transferência de IgG na placenta. A região que une estas partes é capaz de dobrar-se e é suceptível ao ataque das enzimas proteolíticas (papaína e pepsina). A papaína cliva a molécula em três pedaços iguais com massa molecular de aproximadamente 50 kDa. Um dos pedaços é denominado fragmento Fc (Fragment crystaline) e os outros dois pedaços idênticos denominados de fragmentos Fab (Fragment antigen binding). A outra enzima proteolítica, pepsina, cliva a imunoglobulina resultando fragmento $F(ab')_2$, além dos pequenos peptídeos clivados do fragmento Fc.

2.1.1. Imunoglobulina G

A imunoglobulina G (IgG ou γ-globulina) apresenta uma meia-vida relativamente longa (23 dias), é a única classe de imunoglobulina que pode atravessar a placenta em humanos, sendo responsável pela proteção do recém-nascido durante o primeiro mês de vida. Esta classe de imunoglobulinas contribui para a imunidade contra muitos agentes infecciosos que têm uma disseminação através do sangue, incluindo bactérias, vírus, parasitas e alguns fungos [STITES e TERR, 1992].

A estrutura básica da molécula de IgG é constituída de 1328 resíduos de aminoácidos. Cada cadeia pesada contém 450 resíduos de aminoácidos e cada cadeia leve contém 214. A molécula é flexível em forma de Y com massa molar de aproximadamente 150 kDa. Elas apresentam duas cadeias polipeptídicas leves idênticas de aproximadamente 25 kDa cada, que se ligam às duas cadeias polipeptídicas pesadas idênticas de aproximadamente 50 kDa por meio de ligações dissulfídicas, que se estabelecem entre um resíduo cisteínico da cadeia leve e outro da cadeia pesada. As cadeias pesadas estão interligadas, também por pontes dissulfídicas. Em uma cadeia leve existem duas pontes dissulfídicas intracadeia [CALICH e VAZ, 1989].

2.1.2. Subclasses de IgG

As imunoglobulinas G estão presentes cerca de 1,0 grama por 100ml de plasma. Sendo as imunoglobulinas anticorpos que combatem cercas doenças infecciosas (difteria, sarampo, caxumba, tifo e outras) [BAUN, 1978]. Dentro de uma classe ou isotipo de imunoglobulina pode haver variações na estrutura da cadeia pesada. Estas variantes estruturais estão presentes em todos os membros da mesma espécie animal: são as chamadas subclasses. As subclasses de IgG diferem em seu grau de flexibilidade segmentar e sua capacidade de ativar a fixação do complemento e outras funções efetoras. Assim, todas as classes e subclasses devem estar presentes em todo indivíduo normal, havendo, entretanto, pequenas variações de estrutura que são peculiares a grupos populacionais.

Conhecem-se quatro subclasses de IgG humanas: IgG_1, IgG_2, IgG_3 e IgG_4. Elas diferem-se principalmente na região intermediária em termos de número de resíduos envolvidos e número de pontes de dissulfeto. O comprimento e a flexibilidade da cadeia intermediária varia de acordo com as subclasses. A flexibilidade da IgG_4 é intermediária entre

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL

IgG_1 e IgG_2, e IgG_3 apresenta maior comprimento. Propriedades fisico-química diferem nas subclasses: concentração relativa no soro é aproximadamente a seguinte IgG_1 60-70%; IgG_2 19-30%; IgG_3 4-8% e IgG_4 1-6%, variando de indivíduo para indivíduo, e ponto isoelétrico alto para IgG_1e IgG_3 e baixo para IgG_2 e IgG_4 (Tabela 2). Os níveis das subclasses de IgG no soro são influenciados por vários fatores como: idade, alotipo, raça e sexo [VLUG e VAN REMOTEL, 1989].

Existem diferenças nas pontes intercadeias das várias subclasses de IgG. O significado biológico dessas variações não está ainda esclarecido, mas é possível que elas sejam responsáveis por algumas das diferenças observadas em funções como ciclo vital ou suscetibilidade a degradação proteolítica. Por exemplo, a subclasse IgG_2 tem quatro pontes entre as cadeias pesadas e é bastante resistente á hidrólise à papaína.

Tabela 2: **Propriedades físico-químicas das subclasses de IgG humana** (Tabela Modificada- VLUG e VAN REMOTEL, 1989).

	IgG_1	**IgG_2**	**IgG_3**	**IgG_4**
Massa molecular (kDa)	146	146	170	146
Pontes dissulfídicas entre as cadeias pesadas	2	4	11	2
Ponto isoelétrico	8,6 ± 0,4	7,4 ± 0,6	8,3 ± 0,7	7,2 ± 0,8
Concentração de IgG no soro (adulto) [%]	58,4 - 71,5	19,4 – 31,0	4,2 - 8,4	0,7 - 6,5

Alguns estudos indicaram que a deficiências seletiva de subclasses de IgG estão associadas com a suscetibilidade de contrair infecções viróticas ou bacterianas. Crianças com deficiência seletiva em IgG_2 apresentam uma resposta imune deficitária em relação à polissacarídeos de origem bacteriana, de modo que esses pacientes são suscetíveis a infecções causadas por bactérias encapsuladas [VLUG e VAN REMOTEL, 1989].

Assim, como as imunoglobulinas humanas vários outros vertebrados possuem classes e subclasses de anticorpos. No camundongo, por exemplo, foram descritas quatro subclasses de IgG (IgG_{2a} , IgG_{2b} , IgG_1 e IgG_3), duas classes de IgA (IgA_1 e IgA_2) além das classes IgM, IgD e IgE [CALICH e VAZ, 1989].

2.2. Métodos utilizados para separação de IgG a partir do soro ou plasma humano

Os aspectos mais importantes na purificação de anticorpos em larga escala são o grau de pureza da proteína desejada, a alta recuperação e o custo do processo. Tal purificação é de grande interesse no campo terapêutico, uma vez que proteínas altamente purificadas limitam os riscos de efeitos colaterais em pacientes. Por isso, o desenvolvimento de métodos seletivos de purificação em larga escala são hoje indispensáveis para aumentar o rendimento e o grau de pureza das proteínas terapêuticas extraídas do plasma.

O plasma humano é um fluído altamente complexo, constituindo de várias proteínas as quais apresentam concentrações e funções fisiológicas diferentes. Devido a complexidade do plasma, muitas vezes é necessário a realização de várias etapas para a purificar IgG, podendo-se distinguir duas etapas majoritárias. Primeiramente uma etapa de pré-purificação (precipitação, clarificação, diafiltração e/ou concentração por ultrafiltração) e uma segunda etapa de purificação propriamente dita, utilizando técnicas cromatográficas para remover as proteínas contaminantes. Algumas vezes emprega-se uma última etapa de purificação, aplicando a técnica de cromatografia de exclusão molecular, quando é exigido do produto final um grau de pureza elevado. Diversos métodos podem ser empregados para separar IgG do plasma, como mostrado na Figura 2.2.

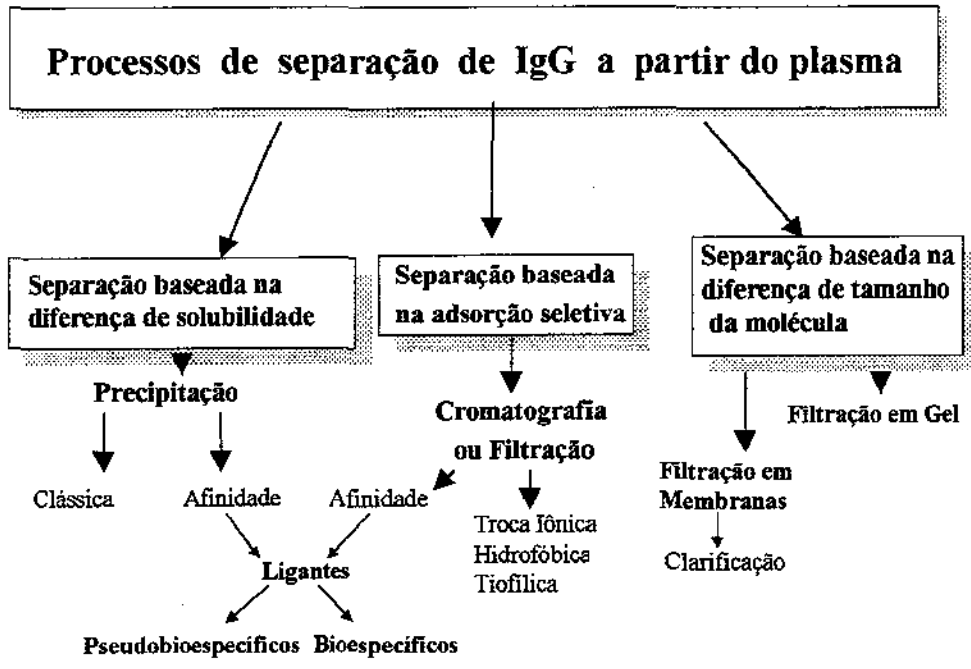

Figura 2.2: Esquema dos métodos utilizados para purificação de IgG.

2.2.1. Separação de IgG baseada na diferença de solubilidade

Dentre os métodos de separação de IgG a partir do plasma humano, temos os que são baseados na diferença de solubilidade cujas técnicas utilizadas são precipitação clássica e precipitação por afinidade.

A maioria das indústrias farmacêuticas utiliza a técnica de precipitação clássica para obter IgG a partir do plasma humano, pois a adição de solventes orgânicos neutros miscíveis, em especial etanol ou acetona, reduz a solubilidade de IgG ao ponto de precipitá-la. Um método antigo, que permanece ainda hoje como cerne do processo na maioria de plantas de fracionamento, é o método Cohn. Este método utiliza etanol como agente de partição da parte majoritária de proteínas do plasma, que são albumina (60 g/l) e imunoglobulina G (8-11 g/l) [COHN et al., 1946]. As fábricas Octapharma Pharmazetika em Viena e Austrália, e Centeon Pharma Ltda na Alemanha produzem IgG humana através da precipitação pelo método Cohn, tratamento com mistura solvente-detergente e incubação a pH 4, com grau de pureza mínimo de 95%, segundo a bula farmacêutica da Octagam ®.

Utilizando quatro parâmetros básicos de solubilidade protéica, isto é pH, força iônica, constante dielétrica e temperatura, podem ser desenvolvidos métodos eficientes para isolamento em grande escala de várias proteínas do soro ou plasma humano, tais como albumina, globulina e fibrinogênio [LEHNINGER, 1986].

Além de permitir a realização do processo em grande escala, os benefícios da técnica de precipitação utilizando etanol incluem a baixa toxicidade do solvente e sua atuação como inativador do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). No entanto, este solvente, apresenta algumas desvantagens significativas como baixa especificidade na purificação de proteínas que se encontram em traços no plasma e potenciais efeitos desnaturantes do etanol e/ou pH baixo, para proteínas sensíveis a essas condições (inibidores de proteases, anti-coagulantes e fatores de coagulação) [BURNOUF, 1995]. O método Cohn se modernizou com o monitoramento do processo por computadores, permitindo precisão e controle do sistema, mas esta modernização não forneceu uma eficiência tão elevada quanto a dos métodos cromatográficos mais recentes desenvolvidos [FOSTER et al., 1986].

Além de se utilizar etanol para isolar imunoglobulinas humana, tem-se usado a precipitação sequencial com ácido capróico e sulfato de amônio. Resultados quantitativos obtidos a partir do teste ELISA demonstraram uma alta eficiência deste método para purificar imunoglobulinas G e A, e eficiência um pouco menor para IgM. Apesar de ser um método

simples, rápido e barato, a utilização de sulfato de amônio para precipitação de imunoglobulinas em larga escala apresenta como dificuldade a remoção deste sal, além da presença de contaminantes [PEROSA et al., 1990].

Outro método de separação de imunoglobulina G humana é a precipitação por afinidade. CHEN e HOFFMAN, 1990, utilizaram o polímero termoreativo poli (N-isopropilacrilamida) conjugado ao ligante proteína A. O complexo formado pelo macroligante se liga a IgG humana com alta especificidade, e apresenta seletividade para sua separação mediante precipitação através da variação de temperatura. Aproximadamente uma entre quatro moléculas de proteína A conjugada ao polímero, se associam a IgG com uma constante de dissociação de 3×10^{-6} M, demonstrando alta afinidade. Os autores concluem que a precipitação por afinidade de imunoglobulina humana é um processo rápido que evita o uso de colunas cromatográficas e que pode ser projetado para operar em sistemas contínuos.

2.2.2. Separação de IgG baseada na diferença de tamanho da molécula

Para purificar IgG a partir do plasma humano por um processo baseado na diferença de tamanho da molécula, pode-se utilizar filtração em gel, também conhecida como cromatografia de exclusão molecular, permeação em gel ou cromatografia em peneira molecular de difusão.

Esta técnica pode ser empregada na fase final do processo de purificação de imunoglobulinas, ou seja, após a purificação intermediária que pode ser por cromatografia de troca-iônica ou cromatografia por afinidade, obtendo um grau de purificação mais alto [ÖSTLUND, 1986]. A desvantagem desta técnica é o tempo de processamento longo comparado com a precipitação salina, mas dependendo das etapas anteriores usadas em conjunto com esta técnica de purificação, a filtração em gel pode ser um método vantajoso em termos de rendimento e purificação [PHILLIPS et al., 1984].

2.2.3. Separação de IgG baseada na adsorção seletiva

Dentre outros métodos de purificação de IgG a partir do plasma humano, temos os que são baseados na adsorção seletiva. Nos últimos anos, as técnicas cromatográficas vêm

sendo progressivamente utilizadas em escala industrial para fracionamento do plasma devido à sua capacidade, seletividade e especificidade, resultando em alto grau de pureza da proteína desejada. No entanto, o maior inconveniente para o emprego dessas técnicas em nível industrial reside na dificuldade de ampliação de escala, o que resulta em um sério problema para a indústria, uma vez que esta necessita fracionar centenas de litros de plasma por dia. Uma combinação entre a técnica de precipitação tradicional do plasma por etanol com métodos cromatográficos têm sido utilizado para recuperar várias proteínas terapêuticas do plasma [BURNOUF, 1995].

Dentre as técnicas cromatográficas utilizadas na etapa de purificação propriamente dita, podemos citar: cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica, cromatografia de afinidade utilizando proteínas A ou G como ligante, cromatografia de pseudobioafinidade utilizando histidina como ligante, sendo que a cromatografia utilizando proteína A como ligante é a mais popular.

Técnicas cromatográficas tradicionais de purificação como cromatografia de troca iônica [JAMES e STANWORTH, 1964] e cromatografia hidrofóbica [GOHEEN e MATSON, 1985] possibilitam facilmente a ampliação do processo para larga escala, uma vez que os adsorventes são de baixo custo e o processo é geralmente reprodutível, além de ser rápido e apresentar boa recuperação dos componentes do plasma. Já se encontram disponíveis no mercado resinas de troca iônica que possibilitam a operação em colunas de leito fluidizado ou expandido. No entanto, uma das desvantagens desses adsorventes é que eles exibem baixa seletividade, acarretando, na maioria das vezes, contaminações significativas da proteína desejada devido a adsorção não-específica.

Um outro método utilizado para purificar IgG é a cromatografia de afinidade, técnica baseada na interação específica de um ligante imobilizado em um suporte sólido com a molécula a ser purificada. VIJAYALAKSHMI, 1989, classifica os ligantes de afinidade como bio ou pseudobioespecíficos (Figura 2.3). Os ligantes bioespecíficos apresentam valores da constante de dissociação na faixa de 10^{-6} a 10^{-9} M, apresentando complexos de afinidade alta. Já os ligantes pseudobioespecíficos apresentam constante de dissociação na faixa 10^{-2} a 10^{-5} M, apresentando complexos de afinidade média.

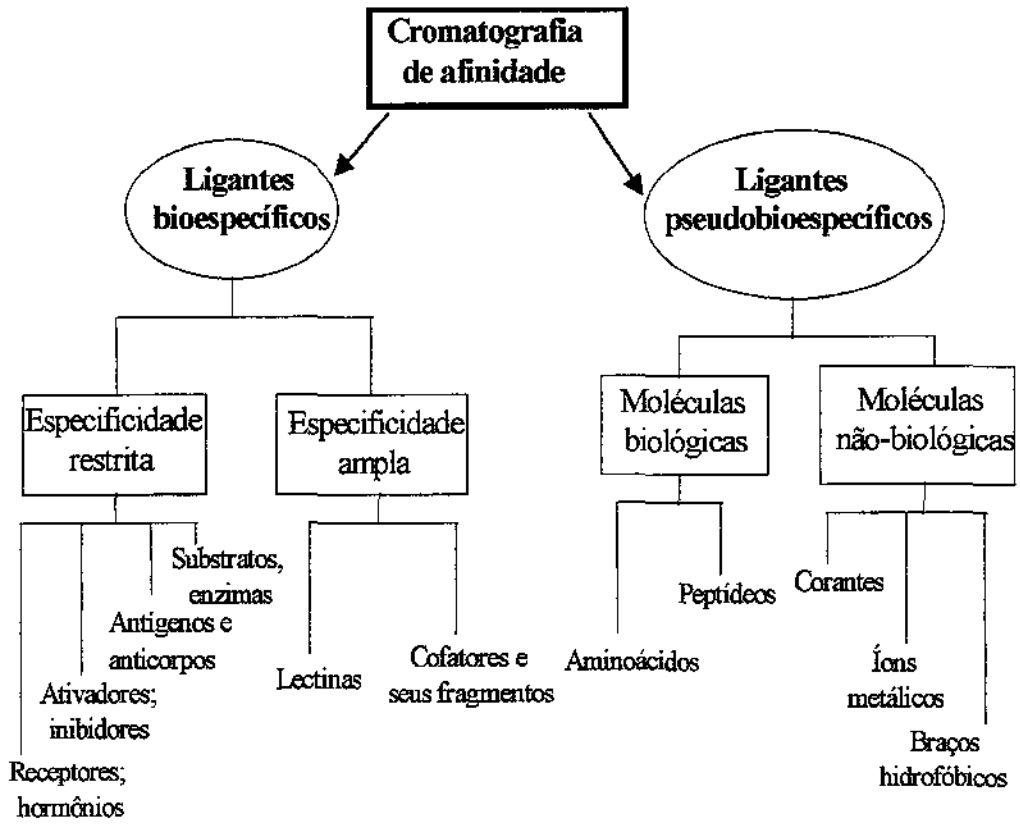

Figura 2.3: Esquema dos ligantes utilizados em cromatografia de afinidade (adaptado de VIJAYALAKSHMI, 1989).

Sistemas de afinidade bioespecíficos

Ligante bioespecífico é um composto biológico, que possui alta afinidade e especificidade por proteínas, custo elevado, podendo sofrer desnaturação e contaminação bacteriana.

Adsorventes utilizando proteína A como ligante bioespecífico (géis e membranas) têm sido utilizados para purificar IgG devido a alta seletividade e afinidade deste ligante pela parte Fc das imunoglobulinas, possibilitando, em um único processo de separação, a obtenção de IgG com um grau de pureza elevado. Devido a esta alta especificidade, este ligante é usado em escala laboratorial e industrial para purificação de imunoglobulina G destinada para fins terapêuticos e testes clínicos em que não haja necessidade da subclasse 3, pois a mesma não é adsorvida em proteína A [DUHAMEL et al.,1979; BOYLE., et al., 1993; BJORCK e KRONVALL, 1984; MANDARO et al, 1987; LEE e CHUANG, 1996; CHARCOSSET et al, 1995]. A separação de subclasses de IgG também tem sido possível com este ligante. LEIBL et al., 1993, empregando a proteína A imobilizada em gel de agarose, realizaram eluição por

gradiente descontínuo de pH entre 8 e 3 e obtiveram um perfil cromatográfico apresentando três picos. No primeiro pico obtiveram 94% de IgG_2, no segundo pico 94% de IgG_1 e 6% de IgG_2, e no terceiro pico somas aproximadamente iguais de IgG_1 e IgG_2. IgG_3 não foi detectada nos picos de eluição, uma vez que esta subclasse não se liga à proteína A e IgG_4, esteve presente nos picos de eluição com níveis abaixo do limite detectado pelo sistema de medida utilizado pelos autores (0,02 mg/ml).

Apesar do método utilizando proteína A como ligante ser bem popular, ele requer condições de baixo pH entre 5 e 3 para a eluição da imunoglobulina, além do ligante apresentar alguns incovenientes, tais como: toxicidade em caso de seu desprendimento, perda da atividade biológica com o tempo de utilização, possibilidade de contaminação bacteriana durante a estocagem, baixa capacidade (ex. Ultrogel e Eupergit C) e alto custo [FÜGLISTALLER, 1989].

Devido ao fato da subclasse 3 não ser adsorvida em proteína A, vários outros ligantes para separação de IgG e suas subclasses têm sido empregados. A proteína G extraída da parede celular de um grupo de bactérias G *Streptococci*, liga-se às quatro subclasses de IgG humana pela sua parte Fc. Resultados de purificação obtidos por diversos pesquisadores mostraram que este ligante é muito eficiente para separação de IgG e das quatro subclasses, porém tem-se o inconveniente deste ligante apresentar custo alto [BJORCK e KRONVALL, 1984; MANDARO et al., 1987; CASSULIS et al., 1991].

Outro ligante bioespecífico utilizado para separação de IgG, porém ainda não popular, é a proteína L isolada da bactéria *Peptostreptoccus magnus*. Esta proteína liga-se especificamente ao domínio variável da cadeia leve das imunoglobulinas, possibilitando a purificação de IgG e fragmentos Fab e Fv (fragmento da região variável das cadeias leves) [NILSON et al., 1993; KOUKI et al., 1997].

Sistemas de afinidade pseudobioespecíficos

Os ligantes pseudobioespecíficos são moléculas pequenas, tais como corantes, aminoácidos, quelatos metálicos os quais possuem especificidade de grupos pelas biomacromoléculas. Ligantes pseudobioespecíficos utilizados em cromatografia de

afinidade para a separação e purificação de proteínas constituem provavelmente o sistema de afinidade pseudobiológico mais utilizado atualmente. Esses ligantes apresentam certas vantagens em relação aos ligantes bioespecíficos (como no caso da proteína A), que são a alta capacidade, baixo custo, estabilidade, complexos de afinidade média, condições brandas de eluição da proteína adsorvida, facilidade de regeneração do adsorvente e não apresentam degradação química ou microbiológica durante a estocagem [VIJAYALAKSHMI, 1989].

O aminoácido histidina tem sido utilizado como ligante pseudobioespecífico para a separação de IgG de diversas fontes. Este ligante, quando imobilizado em géis de Sepharose possibilitou a separação de subclasses 1 e 2 de IgG humana [EL-KAK e VIJAYALAKSHMI, 1992], e quando imobilizado em membranas de PEVA apresentou afinidade pelas subclasses 1 e 3 [BUENO et al., 1995]. Apesar dos bons resultados obtidos, estudos devem ser realizados a fim de verificar a viabilidade da utilização desse método em larga escala.

HUTCHENS e PORATH, 1986, usaram adsorvente tiofílico em agarose (tiofilica-gel), demonstrando ser seletivo e eficiente para purificação de imunoglobulinas a partir do plasma humano. 97 a 99% de IgG é adsorvida quando 10% de sulfato de amônia foi utilizado.

Em escala de laboratório COCHET et al., 1994, verificaram que IgG humana liga-se ao corante Rubine R/K-5L, tendo então utilizado este corante para separar IgG e a subclasse IgG_2. Cobre ligado ao corante foi um elemento importante que contribuiu na afinidade por IgG. Em 1997, HASNAOUI et al., usou o corante Procion Yellow HE-4R imobilizado em matriz Sepharose 4B, purificou a subclasse IgG_2 (76% de IgG_2 em relação a IgG total). Apesar de matrizes utilizando corantes imobilizados apresentarem alta capacidade, seu uso é limitado devido a toxidade desses ligantes em caso de desprendimento.

IMAC (Imobilized Metal Ion Affinity Chromatography), técnica de cromatografia de afinidade que utiliza íons metálicos imobilizados como ligantes pseudobioespecíficos, tem sido apresentada por diversos autores como técnica promissora para purificação de IgG de diversas fontes. PORATH e OLIN, 1983, mostraram que IgG humana pode ser adsorvida em géis contendo íons Ni^{2+} imobilizados.

Mais recentemente, HALE e BEIDLER, 1994, purificaram anticorpos monoclonais de rato do tipo IgG_1 em géis contendo íons Ni^{2+} imobilizados, obtendo um grau de pureza de 90%. Essa purificação foi realizada em uma única etapa, sem a necessidade de uma pré-purificação do sobrenadante de cultura celular (precipitação ou

filtração). Nesse estudo, os autores também demonstraram que esses anticorpos foram adsorvidos nessas colunas pela sua parte Fc.

BODEN et al., 1995, demonstraram a viabilidade de purificar, em uma única etapa, imunoglobulinas a partir do soro de cabra utilizando íons Cu^{2+} imobilizados, obtendo IgG apenas ligeiramente contaminada com albumina.

VÁZQUEZ-MORENO e PLATA, 1996, separou IgG, IgM e IgA a partir do soro de porco utilizando Ni^{2+}-IDA-Sepharose 6B. O fracionamento do soro de porco por IMAC resultou em altas concentrações de IgG, IgM e IgA, livres de albumina no pico eluído com tampão Mops contendo Acetato e NaCl a pH 5,5.

A partir dos resultados publicados por diversos autores, pode-se observar a potencialidade de utilizar íons metálicos imobilizados para purificação de IgG do plasma humano. Além disso, outras proteínas do plasma também podem ser purificadas por IMAC. Uma vez que existe a possibilidade, a indústria poderia investir adquirindo o adsorvente com o agente quelante imobilizado e utilizá-lo não somente para a purificação de IgG, mas também para a purificação de outras proteínas do plasma que apresentam afinidade por metais, tais como fator IX [BURNOUF, 1995], fibrinogênio [SCULLY e KAKKAR, 1982], albumina [ANDERSSON et al., 1987], α_2 –macroglobulina [PORATH e OLIN, 1983], entre outras, trocando apenas o íon metálico e/ou modificando as condições de adsorção e eluição.

2.3. Cromatografia de afinidade usando íons metálicos imobilizados (IMAC)

IMAC foi introduzida por PORATH et al. em 1975 e, desde então, íons metálicos imobilizados têm sido utilizados como ligantes gerais em cromatografia de afinidade para a purificação de várias proteínas e peptídeos. A Tabela 3 apresenta alguns exemplos de proteínas purificadas utilizando essa técnica.

Tabela 3: **Exemplos de proteínas purificadas utilizando IMAC.**

Proteína Purificada	Suporte Cromatográfico	Referência
Lactoferrina	Cu^{2+}-CM-agarose*	LONNERDAL et al., 1977
Carboxypeptidase de *Aspergilus Niger*	Cu^{2+}-IDA-agarose**	KRISHNAN e VIJAYALAKSHMI, 1987
Protamina	Zn^{2+}-IDA-agarose	BIANCHI et al., 1990
Imunoglobulina de cabra	Cu^{2+}-IDA-Novarose	BODEN et al, 1995
Calmodulina bovina	Eu^{3+}-TED-Novarose***	CHAGA et al., 1996

* CM - bis-carboximetil amino agarose

** IDA - ácido iminodiacético

*** TED - tris-carboximetil etileno diamina

As vantagens de se utilizar IMAC em relação aos outros método de cromatografia de afinidade são: diferentes íons metálicos podem ser imobilizados numa matriz, baixo custo e alta capacidade dos ligantes. Não precisa pré-tratar a amostra, constante de dissociação do complexo proteína-ligante na faixa 10^{-2} a 10^{-5} M, apresentando complexos de afinidade média. Após a adsorção as proteínas são eluídas em condições suaves e não desnaturantes, mantendo a mesma atividade inicial, além de métodos específicos de separação que podem ser empregados pela escolha do metal. Os íons metálicos podem ser facilmente removidos da coluna através da regeneração com EDTA, o qual quelata de maneira eficaz cátions divalentes, além de prevenir contaminação bacteriana. Após a regeneração, centenas de vezes a coluna pode ser reequilibrada, e recarregada com diferentes íons metálicos, sem perder a capacidade quelante num período de um ano. Porém existem problemas do uso de IMAC: a alta toxicidade dos íons metálicos podendo existir metais desprendidos no produto final, interações menos específicas, grau de pureza menor que os sistemas bioespecíficos [WONG et al., 1991].

Na IMAC, o princípo da separação baseia-se na adsorção da proteína de interesse em íons metálicos imobilizados numa matriz sólida. O centro de adsorção consiste de dois componentes: o agente quelante e o íon metálico imobilizado. O agente quelante é imobilizado na matriz via um espaçador (epicloridrina ou bisoxirano) através de ligações covalentes. O íon

metálico, por sua vez, é imobilizado através da formação de ligações de coordenação entre o íon metálico e os átomos de nitrogênio ou oxigênio do agente quelante. O agente quelante atua como doador de elétrons, compartilhando, assim, pares de elétrons com o aceptor, o íon metálico [SULKOWSKI, 1985].

Proteínas ou outros solutos introduzidos na fase móvel são adsorvidos em íons metálicos imobilizados através da formação de ligações de coordenação entre resíduos de aminoácido disponíveis na superfície de proteínas: histidina, cisteína e triptofano em menor intensidade, com os íons metálicos. Existem fatores que intervêm na associação do ligante com a proteína em IMAC: natureza do suporte, agente quelante, íon metálico, condições de adsorção, que serão comentadas nos tópicos adiante.

2.3.1. Agente quelante

Existem vários agentes quelantes utilizados na imobilização de íons metálicos em matrizes IMAC: IDA (ácido iminodiacético), TED (tris carboximetil etilenodiamina), NTA (ácido nitrilotriacético), CM-Asp (ácido carboximetil aspártico), TEPA (tetraetilenopentamina) e CM-DASA (ácido carboximetil α, β diamino succínico), devendo ser escolhido aquele que proporciona estabilidade do complexo com o metal, além de dispor de sítios livres de coordenação para ligar-se a proteína.

As propriedades do centro de adsorção dependem fortemente do agente quelante utilizado. Em geral, quanto mais polidentado for o agente quelante, mais estáveis são os complexos formados com os íons metálicos, porém poucos sítios permanecem disponíveis para a ligação com a proteína e a mesma seria adsorvida mais fracamente. Este fenômeno acorre com o agente quelante TED (tris-carboximetil etileno diamina) (Figura 2.4 a), por ser um quelante pentadentado (dois átomos de nitrogênio e três átomos de oxigênio para coordenação) se liga mais fortemente ao íon metálico, assim íons metálicos hexacoordenados (Cu^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{3+}, Co^{2+} e Zn^{2+}) terão disponível somente um sítio para a formação de um complexo com peptídeos e proteínas. Como a ligação metal-proteína é fraca, este agente quelante é normalmente utilizado para purificar proteínas que apresentam a tendência de retirar o metal da coluna, possibilitando uma purificação da proteína sem traços do íon metálico [SULKOWSKI, 1985].

O agente quelante mais utilizado em IMAC é o ácido iminodiacético (IDA)

(Figura 2.4 b), por ser tridentado (um átomo de nitrogênio e dois átomos de oxigênio para coordenação) forma um complexo com o metal ocupando três sítios de coordenação. Íons metálicos hexacoordenados apresentarão três sítios livres para formação de ligações de coordenação com a proteína [WONG et al., 1991].

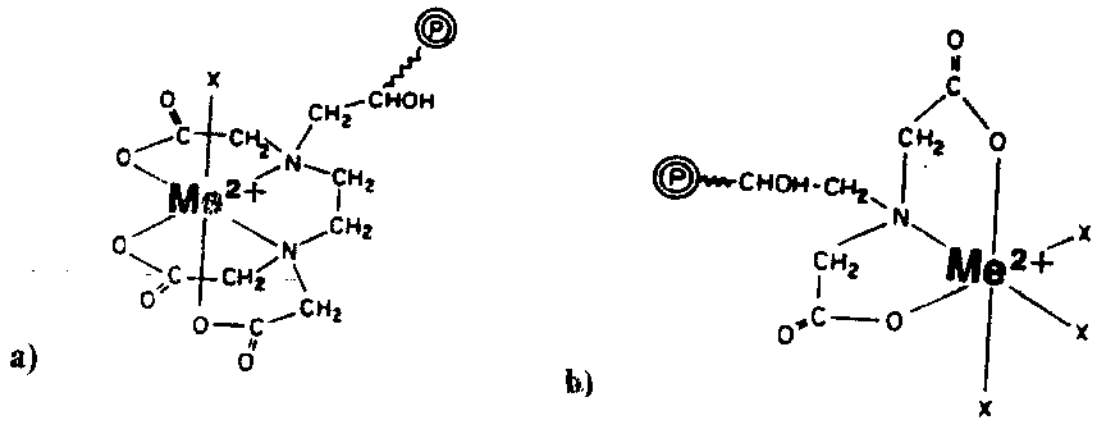

Figura 2.4: O metal hexacoordenado pode ter um simples a) ou múltiplo b) sítio de adsorção dependendo do agente quelante utilizado. a) agente quelante: tris-carboximetil etileno diamina (TED); b) ácido iminodiacético (IDA).

Estudos indicam que a constante de formação de quelatos metálicos, quando os agentes estão imobilizados em suportes sólidos, são da mesma ordem de grandeza das constantes obtidas para compostos análogos em solução. A estabilidade relativa dos complexos formados com IDA: $Cu^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} \geq Co^{2+} >> Ca^{2+}, Mg^{2+}$ [WONG et al., 1991].

Representação esquemática do complexo IDA-Sepharose ativada com epicloridrina (espaçador, que contêm três átomos de carbono) se encontra na Figura 2.5.

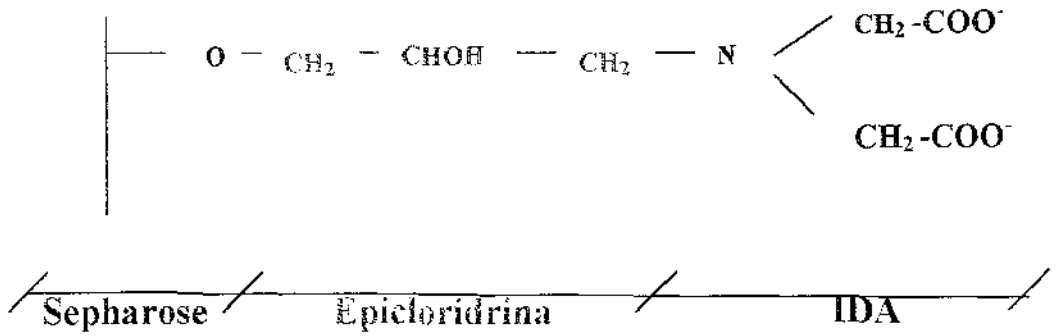

Figura 2.5: Estrutura do suporte cromatográfico utilizado em IMAC, IDA-Sepharose.

2.3.2. Íons metálicos utilizados em IMAC

Em princípio, todos os metais susceptíveis de interagir com proteínas podem ser utilizados em IMAC. Fe^{3+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Al^{3+} e Ca^{2+} são os íons metálicos mais comumente utilizados [SULKOWSKI, 1989]. Os íons metálicos Fe^{3+} e Al^{3+} ligam-se a fosfato e fosfoésteres primários, oferecendo, dessa forma, a possibilidade de serem utilizados para separar fosfoproteínas [ANDERSSON e PORATH, 1986; SULKOWSKI, 1988]. O íon Ca^{2+} coordena o átomo de oxigênio presente no grupo carboxílico dos resíduos dos aminoácidos aspartato e glutamato da molécula, podendo ser utilizado para purificação de proteínas que contenham vários grupos carboxílicos próximos [MANTOVAARA et al., 1991].

A retenção depende, em IMAC, do número e tipo de grupos de aminoácidos que podem interagir com o metal, sendo influenciada por variáveis independentes tais como pH, temperatura, tipo de solvente, tipo e concentração de sal, natureza do metal imobilizado, densidade de ligante e tamanho da proteína. A análise da retenção de peptídeos e proteínas em géis de IDA-Cu^{2+}, -Ni^{2+}, -Zn^{2+} e -Co^{2+} mostrou forte afinidade desses géis pelos resíduos histidina acessíveis, presentes nessas proteínas e peptídeos. SULKOWSKI, em 1989, estabeleceu as seguintes regras que governam a interação histidina/IDA-Cu^{2-}, -Ni^{2-}, -Zn^{2+} e -Co^{2+}, que são resumidas na Tabela 4.

- a presença de pelo menos um resíduo histidina disponível para a coordenação é suficiente para a retenção da mesma em um gel de IDA-Cu^{2+};
- a presença de dois resíduos histidina disponíveis para a coordenação resulta em

uma retenção mais forte da proteína em um gel de IDA-Cu^{2+};

- a presença de resíduos de triptofano disponíveis para a coordenação é suficiente para a retenção da mesma em um gel de IDA-Cu^{2+};

- proteínas que não apresentam resíduos histidina ou triptofana disponíveis para coordenação, não são retidas em um gel de IDA-Cu^{2+};

- a presença de dois resíduos histidina disponíveis para a coordenação é requerida para a retenção em um gel de IDA-Ni^{2+};

- a presença de dois resíduos histidina espacialmente localizadas em uma α-hélice e separadas por dois ou três aminoácidos é requerida para a retenção em géis de IDA-Zn^{2+} e de IDA-Co^{2+}.

- a retenção de uma proteína que possui dois resíduos histidina vicinais (efeito quelato, ou seja aumento da estabilidade devido a quelação do metal) será mais forte, em todos os géis IDA-Me^{2+}, que a retenção de uma proteína que possue dois resíduos histidina bem espaçados na estrutura tridimensional.

Assim, SULKOWSKI, 1989, mostrou que a força de retenção das proteínas seguia a seguinte ordem:

$$Cu^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} \geq Co^{2+}$$

Tabela 4: **Reconhecimento dos resíduos histidina por IDA-Me^{2+} ***

Ligante/Me^{2+}	**Cu^{2+}**	**Ni^{2+}**	**Zn^{2+}**	**Co^{2+}**
1. –His-	+	-	-	-
2. -His-$(X)_n$-His-	+	+	-	-
3. – His-$(X)_n$-His- n(2;3); α-hélice	+	+	+	+
4. (-His His-) (enovelamento)	+	+	+	+

*Tampão 20 mM Fosfato contendo 1 M de NaCl a pH 7

(+: resíduos histidina ligam ao íon metálico, -: resíduos histidina não ligam ao íon metálico)

2.3.3. Seleção da Matriz

Existe uma variedade de suportes, as matrizes hidrofílicas são geralmente requeridas em cromatografia líquida, pois reduz as interações não específicas. Há suportes de materiais inorgânicos (sílica, vidro poroso e cerâmica), de polímeros orgânicos naturais (agarose, dextrana e celulose) e de polímeros orgânicos sintéticos (poliacrilamida, derivados de ácido acrílico e metacrílico) utilizados em IMAC.

Algumas propriedades requeridas na escolha do suporte cromatográfico são: uniformidade no tamanho e forma das partículas para um bom empacotamento da coluna, resistente a ataques microbianos ou enzimáticos e mecanicamente estável. Além de uma área superficial adequada para se ter alta capacidade, aconselha-se portanto utilizar suportes com tamanho pequeno de partículas, pois aumenta a eficiência na imobilização de ligantes, devido a maior área superficial disponível para ativação [WONG et al., 1991]. A matriz deve ser selecionada também em função da pressão do sistema cromatográfico. Agarose é a mais utilizada em IMAC, sendo usada em cromatografia líquida de baixa pressão. Já a sílica é utilizada em cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) [JANSON, 1998].

HEMDAN e PORATH, 1985 usaram matriz de agarose covalentemente ligada a IDA, por ser um polímero orgânico que apresenta uma rigidez considerável, estável entre pH 3 e 14, hidrofílico, macroporoso e permite ser regenerado mais de cem vezes sem deteriorização. Agarose é comercialmente chamada de Sepharose pela Pharmacia Biotech, apresentando três faixas de fracionamento 2B, 4B e 6B (correspodem a porcentagem de material seco no gel). Sepharose 6B apresenta diâmetro entre 45 e 165 μm, e permite vazão e pressão máxima de operação de 1,16 ml/min e 9 kPa respectivamente [COLLINS et al., 1995].

Matrizes de polímeros sintético e sílicas apresentam vantagens sobre matrizes de agarose ou dextrana: maior estabilidade mecânica, forma e estrutura mais rígida, e variação pequena de volume durante o uso [WONG et al., 1991].

2.3.4. Escolha dos sistemas tamponates

A escolha correta do tampão de adsorção possibilita máxima retenção da proteína de interesse, por Me^{2+}-IDA gel, devendo-se considerar o pH, a força iônica e a molaridade da solução tamponante, para que haja uma máxima formação do complexo metal-proteína

[ANDERSON e PORATH, 1986]. PORATH em 1987, estudou várias proteínas e verificou que a seletividade da dessorção pode ser afetada com o aumento da concentração de sal, NaCl. Tampões zwiteriônicos tais como Mops, Mes, e Hepes, promovem uma retenção forte das proteínas em matrizes para IMAC, uma vez que não interagem com os íons metálicos imobilizados. Tampões como Tricina ou Citrato, devem ser evitados por serem agentes fracamente competitivos, os quais possibilitam menor afinidade da proteína pelo íon metálico. Tris e sais de Acetato e Fosfato também atuam como competidor fraco pelo sítio de ligação do metal, porém mais fracos que Tricina e Citrato. Imidazol no tampão de eluição é utilizado como agente competidor forte. A adição de 1 M de NaCl nos tampões de adsorção e eluição, com intuito de impedir interações eletrostáticas entre algum grupo aminoácido e IDA, aumentar a capacidade da adsorção, seletividade e a estabilidade do complexo metal-proteína formado [PORATH e OLIN, 1983].

2.3.5. Condições de adsorção

PORATH et al. em 1975, levantou a hipótese que em IMAC somente os resíduos de histidina, cisteína e triptofano localizados na superfície da proteína poderiam formar ligações de coordenação estáveis entre seus átomos doadores de elétrons (N, S, O), e os íons metálicos imobilizados. Estudos provam que a histidina é de maior importância na retenção de proteínas por IMAC, seguida pela cisteína que também intervém no fenômeno, mas em menor proporção, e pelo triptofano que apesar de indicações de seu envolvimento, aparentemente não apresenta afinidade para intervir sozinho no fenômeno de retenção.

Na interação de resíduos histidina, o nitrogênio do anel imidazol é o grupo doador de elétrons para os íons metálicos, sendo a histidina o grupamento de maior afinidade. Já os resíduos cisteína não foi verificado experimentalmente a afinidade pelos íons metálicos [WONG et al., 1991].

O grupo imidazol da histidina e o grupo tiol da cisteína em condições de pH 7 são fortemente adsorvidos pelos íons metálico Cu^{2+} e Zn^{2+}. Outros íons metálicos: Co^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+}, Cd^{2+}, Mg^{2+} e Ca^{2+}, coordenam com os resíduos histidina e cisteína embora a afinidade da proteína por estes íons é geralmente menor do que com Cu^{2+} e Zn^{2+} [HARRIS e ANGAL, 1989].

A adsorção de proteínas em quelatos IDA-Me^{2+} têm sido realizada entre pH 6 e 8,

quando os íons metálicos apresentam afinidade pelos resíduos histidina, pois os grupos doadores de elétrons da proteína estão desprotonados em pH neutro. No entanto, nas proteínas, o pK_a de cada resíduo histidina pode variar em função dos resíduos de aminoácidos vizinhos e modificar o pH de adsorção. Sendo a força iônica uma variável independente bastante importante na adsorção, usa-se concentrações altas de sal (0,5 a 1M NaCl) nos tampões de adsorção, impedindo assim, as interações não específicas do tipo eletrostáticas, além de aumentar a seletividade e a capacidade, pois aumenta a estabilidade do complexo metal-proteína. Desta forma ao utilizar uma concentração alta de sal (1 M), forças de van der Waals tornam-se importantes para a adsorção [WONG et al., 1991].

Estudos de PORATH e OLIN em 1983, verificaram que o íon metálico Fe^{3+} imobilizado na matriz IDA-Sepharose, apresentava afinidade específica por resíduos tirosina. Como o pH da adsorção pode variar em função do íon metálico utilizado, cromatografias utilizando os metais duros Ca^{2+} e Fe^{3+}, a adsorção ocorre geralmente a pH mais baixos (entre 5 e 6). Quando o íon metálico Fe^{3+} é utilizado, não se deve colocar sal ao tampão de adsorção [WINZERLING et al., 1992].

2.3.6. Condições de eluição

Os principais procedimentos para eluir proteínas utilizados em IMAC consiste em: adição de um agente competidor e protonação das proteínas através do gradiente descontínuo de pH.

Proteínas adsorvidas em suportes contendo íons metálicos imobilizados podem ser eluidas a pH 7,0 por competição com outra espécie doadora de elétrons (agentes competidores, ex. histidina, imidazol, glicina e cloreto de amônia). Estes agentes competidores vão competir com o sítio de adsorção da proteína. Durante a eluição por competição usando imidazol, a coluna deve ser saturada com tampão de maior concentração de imidazol, e em seguida equilibrada com tampão de mais baixa concentração de imidazol [SULKOWSKI, 1985]. Este procedimento é necessário devido ao fato do imidazol se ligar aos íons metálicos quelatados livres liberando prótons, causando abaixamento de pH entre 1 e 2, em algumas regiões da coluna. Desta forma não se sabe se a eluição foi por competição ou por abaixamento de pH. Quando se utiliza um agente competidor, sua eliminação deve ser rigorosa, pois proteínas purificadas com traços de

imidazol provoca efeitos colaterais a pacientes que delas utilizam [BEITLE e ATAAI, 1993].

Outro tipo de eluição pode ser realizada por gradiente descontínuo de pH. Os íons H^+ no meio provocam a protonação de grupos doadores de elétrons na superfície da proteína, eluindo devido enfraquecimento das ligações metal-proteína. Quando se utiliza o íon metálico Co^{2+}, não se deve eluir as proteínas por gradiente descontínuo de pH, pois ocorre desprendimento do íon metálico, sendo necessário a utilização de um agente competidor a pH neutro para eluir as proteínas. Para géis contendo íons metálicos Fe^{3+} imobilizados, as proteínas são adsorvidas fortemente a pH 5,0. Neste caso, as proteínas podem ser eluídas aumentando o pH e/ou a concentração de sal [WINZERLING et al, 1992].

As proteínas também podem ser eluídas através da regeneração da coluna utilizando um agente competidor mais forte que o utilizado na imobilização do metal, sendo eluído o complexo metal-proteína. O agente quelante mais utilizado é o ácido etilenodiamino tetraácido (EDTA), o qual compete entre as ligações suporte-metal e não entre metal-proteína. EDTA quelata de maneira eficaz cátions divalentes como Cu^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+} e Zn^{2+}, sendo um exemplo de efeito quelato, aumentando a estabilidade devido a quelação do metal. Neste tipo de eluição não há seletividade, pois a proteína de interesse fica contaminada com outras proteínas juntamente adsorvidas [SULKOWSKI, 1985].

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, são apresentados os materiais e as metodologias empregados no trabalho. No que diz respeito às metodologias, são apresentados métodos analíticos, como o de quantificação de proteínas, cromatografia, titulação para detectar desprendimento de metal na coluna, ultrafiltração, eletroforese SDS-PAGE, focalização isoelétrica, imunodifusão radial e nefelometria.

3.1. Materiais

Albumina de soro bovino (BSA), γ-globulina humana (IgG humana pura), ácido morfolinoetanosulfônico (Mes), ácido morfolinopropanosulfônico (Mops), coomassie brilliant blue G250, coomassie brilliant blue R250, SDS (dodecil sulfato de sódio), glicerol, cloreto de sódio, sulfato de níquel, cobalto e zinco hexahidratado, e agarose foram adquiridos da Sigma (EUA). Ácido etilenodiamino tetraácido (EDTA), azul de bromofenol, TEMED (N, N, N', N'-tetra-methylenediamine), persulfato de amônia, solução estoque de acrilamida/bisacrilamida (30%T-2,7%C), β-mercaptanoetanol, glicina e Tris (Tris hidroximetil-aminometano) foram adquiridos da Bio-Rad (EUA). Ácido o-fosfórico (85%), fosfato de sódio bibásico e monobásico, formol e nitrato de prata foram adquiridos da

Ecibra (Brasil). Acetato de sódio foi adquirido da Reagen (Brasil). Hidróxido de sódio, ácido acético glacial e álcool etílico absoluto foram adquiridos da Synth (Brasil). Imidazol, carbonato de sódio, álcool metílico, álcool iso-propílico, cloreto de potássio, fosfato de potássio monobásico, nigro de amido e ácido clorídrico fumegante foram adquiridos da Merck (EUA). TCA (ácido tricloroacético) e glutaraldeido foram adquiridos da Nuclear (Brasil). Kit de marcadores para alta massa molecular, kit de marcadores de ponto isoelétrico 3-10, Phast gel IEF 3-9 e ditiotreitol foram adquiridos da Pharmacia Biotech (Suécia). Anti-soro humano: IgG, IgM e IgA foram adquiridos da Hoechst-Behring (Alemanha).

Utilizou-se água ultrapura Milli-Q para a preparação de todas as soluções. O gel Sepharose 6B foi adquirido da Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala (Suécia). Membranas para a ultrafiltração (YM 10 e Centricon-10) foram obtidas da Amicon (EUA).

Soro e plasma (agente anti-coagulante: citrato de sódio) humano sadio foram doados por Sandra Vançan, e centrifugados no Laboratório de Patologia da Unicamp, a fim de separar plasma ou soro de hemácias, plaquetas e leucócitos.

3.2. Métodos

3.2.1. Quantificação de proteína

A proteína total presente em amostras foi quantificada através de absorbância a 280 nm e através do microensaio apresentado por BRADFORD, 1976. No primeiro caso, a quantificação da solução foi determinada assumindo coeficiente de extinção 14 para 1% da solução de IgG, e no segundo caso, foi determinada multiplicando a absorbância a 595 nm pelo volume da fração coletada e dividindo por um fator. Este fator foi obtido pelo coeficiente angular da curva de calibração, o qual utiliza albumina de soro bovino como proteína padrão.

3.2.2. Imobilização de ácido iminodiacético (IDA)

O gel de agarose (Sepharose 6B) foi ativado via introdução de um composto reativo bifuncional (epicloridrina). Epicloridrina atua como braço espaçador, apresentando três átomos de carbonos em sua estrutura, os átomos laterais ligam covalentemente aos átomos de oxigênio da matriz em meio alcalino, produzindo uma matriz ativada. Após a

remoção do excesso de ativante, em solução aquosa foi realizada a imobilização do agente quelante tridentado IDA à matriz ativada, conforme descrito por PORATH et al., 1975, PORATH e OLIN, 1983. O gel foi sintetizado pela Dra. Sônia Maria Alves Bueno.

3.2.3. Cromatografia em coluna com gel de agarose IDA-Me^{2+}

O gel IDA-Sepharose 6B foi lavado com água ultrapura em sistema de filtro a vácuo, utilizando o funil de Büchner e em seguida foi desgaseificado e introduzido em uma coluna cromatográfica, (10 mm de diâmetro interno e 130 mm de comprimento, Bio-Sepra, EUA). Utilizou-se um volume de leito de 3 ml nos experimentos com IgG pura e soro humano, e usou-se um volume de leito de 5 ml nos experimentos com plasma humano, a fim de verificar a seletividade do gel IDA-Me^{2+}.

Os experimentos foram realizados em um sistema de cromatografia de baixa pressão. A coluna cromatográfica em modo frontal foi conectada a uma bomba peristáltica (Econo Pump-Bio Rad, EUA). A corrente de saída da coluna, durante todo o experimento esteve conectada a um monitor de medida de absorbância a 280 nm (Econo UV Monitor-Bio-Rad, EUA), cujos sinais eram emitidos continuamente ao aquisitor de dados (HP 3852A, EUA). Ao receber os dados do aquisitor, um microcomputador (HP 9153C, EUA) plotava um cromatograma referente aos dados obtidos. O equipamento cromatográfico usado está representado na Figura 3.1. Através da bomba peristáltica, a água ultrapura foi alimentada na coluna cromatográfica a uma vazão de 0,5 ml/min (vazão utilizada em todas as etapas da cromatografia) e, em seguida, a coluna foi carregada com uma solução de sulfato de cobre, sulfato de níquel, sulfato de cobalto ou sulfato de zinco a 50 mM, conforme o experimento. A coluna foi lavada novamente com água ultrapura e posteriormente 5 a 10 vezes o volume da coluna com tampão de pH mais baixo ou concentração alta do agente competidor, para eliminar os íons metálicos fracamente quelatados. Em seguida, a coluna foi equilibrada com a solução tamponante usada na etapa da adsorção. Vários tampões foram testados para adsorção: MMA (Mes, Mops e Acetato) 50 mM a pH 7, fosfato 50 mM a pH 7, Tris-HCl 25 mM e Mops 25 mM contendo 2 mM de imidazol a pH 7. MMA 50 mM a pH 6, 5 e 4 , fosfato 50 mM a pH 6, acetato 100 mM pH 5 e 4, Tris-HCl a 50, 100, 150 e 200 mM a pH 7 e Mops 25 mM contendo 10, 20, 30, 50 e100 mM de imidazol a pH 7 foram testados na etapa de eluição. Todos os tampões utilizados com exceção do Tris-HCl, continham 1 M de NaCl. Para o caso do tampão

contendo imidazol, foi necessário primeiramente saturar a coluna com 20 mM imidazol e posteriormente equilibrar com 2 mM de imidazol [YIP e HUTCHENS, 1994].

Uma vez a coluna estando equilibrada, uma solução de IgG humana pura, em concentração de 1mg/ml no tampão usado na etapa de adsorção, foi injetada (2 mg) na coluna. Para ensaios de adsorção de IgG a partir do plasma e soro humano, 1ml diluído com 1ml do tampão foi injetado.

Finalizada a injeção, a coluna foi lavada com o mesmo tampão utilizado na etapa de adsorção com o intuito de eliminar as proteínas que não foram adsorvidas. As proteínas adsorvidas foram eluídas por gradiente descontínuo de pH (abaixamento de pH) ou por agente competitivo (concentrações crescentes de imidazol), dependendo do experimento. Após a eluição da proteína, a coluna foi regenerada com solução de EDTA a 50mM, pH entre 6,0 e 7,0. A corrente de saída foi coletada em frações de 4 ml.

As frações obtidas foram monitoradas a 280mm e quantificadas pelo método de Bradford. Os experimentos foram realizados no mínimo em duplicata.

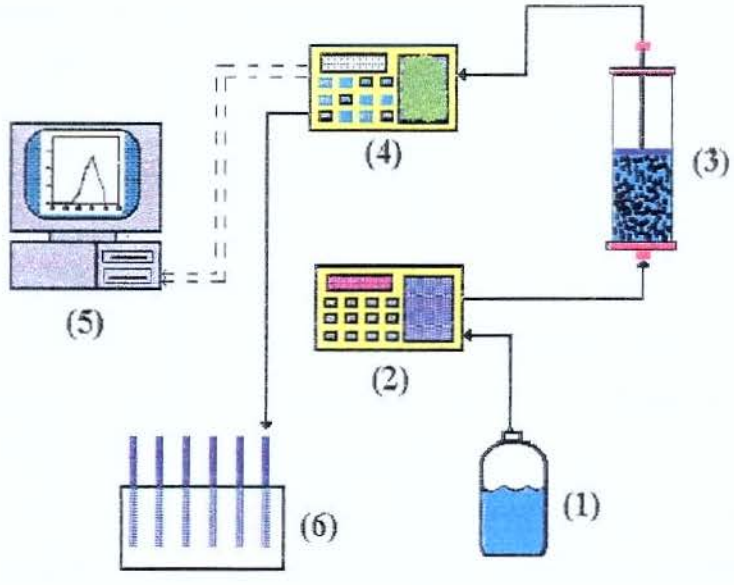

Figura 3.1: Esquema do equipamento cromatográfico. (1) Solução de alimentação; (2) Bomba peristáltica; (3) Coluna cromatográfica; (4) Detector UV, (5) Sistema de aquisição de dados; (6) Coletor de frações.

3.2.4. Ensaio usando duas colunas cromatográficas

Para ensaios com soro humano utilizou primeiramente uma coluna com íon metálico Zn^{2+} imobilizado. Esta coluna foi lavada com tampão Acetato 100 mM a pH 4 e em seguida foi equilibrada com tampão Fosfato 50 mM a pH 7, ambos tampões contendo 1 M de NaCl. Injetou-se 1 ml do soro humano diluído com 1 ml do tampão de equilíbrio. Posteriormente cerca de 90% das frações de lavagem foram agrupadas (o restante foi guardada para realização da eletroforese SDS-PAGE) e injetada numa segunda coluna contendo Ni^{2+}, Cu^{2+} ou Co^{2+} imobilizado. No caso desta segunda coluna ser equilibrada com outro tampão (Mops contendo imidazol e NaCl), a injeção das frações de lavagem foram precedidas por uma diafiltração (diafiltrou-se dez vezes o volume a ser injetado), usando uma célula Amicon (modelo 8050 com membrana YM 10, EUA). Após a adsorção das proteínas nesta segunda coluna, fez-se a lavagem, e posteriormente a eluição por decréscimo de pH ou por adição de um agente competidor (concentrações crescentes de imidazol), dependendo do experimento. Após a eluição, as colunas foram regeneradas com um agente quelante forte, EDTA a 50 mM.

3.2.5. Verificação do desprendimento de metal da coluna

Em IMAC, muitas vezes pode ocorrer desprendimento de metal antes e durante a cromatografia, com a possibilidade de contaminar a proteína de interesse. Assim, análises foram realizadas a fim de verificar se o metal estava se desprendendo da coluna antes da cromatografia.

O desprendimento de metal da coluna foi determinado através de medidas espectofotométricas e titulação, conforme o caso. Para os metais Cu^{2+}, Ni^{2+} e Co^{2+} determinou-se o comprimento de onda de adsorção, através da varredura do espectro, tendo-se obtido λ (comprimento de onda) de 809 nm para o Cu^{2+}, λ de 394 nm para o Ni^{2+}, λ de 511 nm para o Co^{2+}. Já para o íon metálico Zn^{2+} foi realizado titulações com Na_2CO_3 a 2M, pois se houvesse desprendimento do íon metálico Zn^{2+} formaria um precipitado branco [BEITLE e ATAAI, 1993].

A coluna foi primeiramente lavada com tampão de mais baixo pH (pH 4) ou alta concentração do agente competidor (20 mM de imidazol), e posteriormente foi lavada com tampão de mais alto pH (pH7) ou mais baixa concentração do agente competidor (2 mM de

imidazol), dependendo do experimento. Nessas duas etapas foram observadas através das frações recolhidas, se houve desprendimento do íon metálico.

3.2.6. Ultrafiltração

A ultrafiltração foi realizada para concentrar as frações de lavagem e de eluição, obtidas a partir da cromatografia com plasma ou soro humano. Para a revelação com coomassie blue e nitrato de prata, usou-se 0,1 mg/ml da amostra. A ultrafiltração da amostra foi realizada em uma célula Amicon (modelo 8050 com membrana YM 10, EUA), montada e conectada a um cilindro de nitrogênio, sendo a máxima pressão recomendada de operação 70 psi. Continuou-se a ultrafiltração em centrífuga utilizando Centricon modelo 10 (Amicon, EUA), quando a concentração da proteína na solução ainda não era suficiente para a realização da eletroforese. Esta ultrafiltração funciona sobre a ação de uma força centrífuga, tendo-se utilizado uma centrífuga (HITACHI modelo Himac CF-15D, Japão) com um rotor de ângulo fixo modelo RT 15A5. Utilizou-se uma força centrífuga máxima de 5000 rpm x g, que esta dentro dos valores suportados pela membrana.

3.2.7. Eletroforese SDS-PAGE

Na eletroforese SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis), as proteínas são separadas segundo as diferenças de tamanho, este processo determina a massa molecular de proteínas. Para realização da eletroforese SDS-PAGE, utilizou-se um detergente aniônico, SDS, este detergente em conjunto com a proteína forma um complexo carregado negativamente, movendo-se no sentido anôdico (parte inferior do gel). Os géis de poliacrilamida servem de peneiras moleculares, os quais apresentam tamanhos de poros que podem ser controlados pela escolha de concentrações variáveis de acrilamida e de bisacrilamida. Assim, o tamanho efetivo dos poros diminui com o aumento da concentração de acrilamida. As proteínas pequenas movem-se rapidamente através do gel, enquanto as grandes permanecem em cima, perto do ponto de aplicação[LEHNINGER, 1986].

As análises de eletroforese em gel de poliacrilamida foram realizadas de acordo com protocolo descrito por LAEMMLI, 1970. Usou-se duas cubas verticais de tamanhos diferentes fabricadas pela Bio-Rad (EUA), gel de acrilamida 10% e espassador de 1mm. As

amostras (0,1 mg/ml) foram previamente aquecidas à 100°C durante sete minutos em tampão contendo SDS e β-mercaptanoetanol, condição de desnaturação das proteínas pela quebra das ligações de dissulfeto. Usou-se marcador de alta massa molecular (tiroglobulina, 330 kDa; ferritina, 220 kDa; albumina, 67 kda; lactato, 36 kDa). Para a cuba maior seguindo seu protocolo utilizou-se voltagem constante à 80V para o gel de concentração e 140 V para o gel de separação, já para a cuba menor utilizou-se uma voltagem constante de 200V. Uma vez finalizada a separação das proteínas segundo as diferenças de tamanho, o gel foi retirado das placas de vidro e em seguida, as bandas foram visualizadas através das etapas de coloração do gel, método tradicional de Coomassie Brilliant Blue G250: detecta μg, descrito por BLAKESLEY e BOEZI, 1977, e método tradicional de nitrato de prata: detecta em ng, descrito por MORRYSSEY, 1981. Finalmente o gel foi acondicionado numa solução de preservação (13% glicerol e 10% ácido acético).

3.2.8. Focalização Isoelétrica

IEF (Isoeletric Focusing) é uma técnica eletroforética na qual moléculas anfóteras são separadas segundo seu ponto isoelétrico (pI), ao longo de um gradiente contínuo de pH. As proteínas são espécies anfóteras, carregadas positivamente em pH abaixo de seu pI e carregadas negativamente em pH acima do pI. O ponto isoelétrico de uma proteína é o pH no qual o balanço de cargas é zero, e, portanto, sua mobilidade eletroforética é zero. Quando uma proteína é submetida a um campo elétrico em um gel que apresenta um gradiente de pH, essa proteína migrará em direção ao eletrodo de carga oposta até o pH correspondente ao seu pH isoelétrico.

A focalização isoelétrica pode prontamente separar proteínas com diferença de pI de só 0,01, o que significa que pode ser separadas proteínas com uma só carga de diferença. As proteínas dessalinizadas são aplicadas na parte superior do gel de poliacrilamida, migrando todo o gel durante a focalização isoelétrica. Em tal gel, as proteínas são separadas na direção horizontal com base em ponto isoelétrico [LEHNINGER, 1986]. As proteínas foram submetidas a focalização isoelétrica através do equipamento LKB-Phast System, fabricado pela Pharmacia Biotech (Suécia), usou-se kit de marcadores de ponto isoelétrico 3-10 e Phast gel IEF 3-9. Após a focalização isoelétrica a partir do método existente no

equipamento (trinta minutos), procedeu a coloração à quente com solução de nitrato de prata, segundo protocolo descrito por HEUKESHOVEN e DERNICK, 1985.

3.2.9. Imunodifusão radial

A imunodifusão radial permite análises em gel de agarose, demonstrando qualitativamente a presença de anticorpos, através da reação entre antígenos e anticorpos mediante suas migrações no gel [MAYER e WALKER, 1990].

A presença das classes IgA, IgG e IgM podem ser visualizadas através da imunodifusão radial, sendo necessário primeiramente preparar o gel de agarose a 1% em tampão salino PBS a pH 7,4 (cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio e água destilada). Após sua gelificação sobre uma lâmina de vidro, foram feitos orifícios para aplicação de 10µl da amostra (material com soro a ser testado) e 10µl do antígeno (anti-soro humano IgG, IgM e IgA). Este ensaio de imunodifusão radial leva cerca de 48 a 60 horas a temperatura ambiente, sendo que este tempo depende da reação. Assim que a imunodifusão se completou, lavou-se a lâmina com PBS sob agitação. O procedimento de coloração foi realizado com uma solução corante para imunodifusão (nigro de amido, coomassie brilliant blue R250, ácido acético, etanol e água destilada).

A imunodifusão radial foi realizada no Laboratório de Imunologia Clínica da Unicamp, sob supervisão do Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner.

3.2.10. Nefelometria

Através de nefelometria fez-se a dosagem dos níveis de IgG, IgM, IgA e transferrina conforme descrito no manual do nefelômetro (Array 360 System, Beckman, EUA). IgG, IgA e IgM foram dosadas no Laboratório de Imunologia da Unicamp, chefiado pela Dra. Luciana Câmara Bertozzi. A transferrina, foi dosada no Laboratório de Patologia da Unicamp, chefiado pela Dra. Paula Virginia Bottini.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaios preliminares

Uma vez que íons metálicos imobilizados adsorvem várias proteínas (ligantes pseudobioespecíficos), condições ideais para a purificação de IgG a partir do plasma precisaram ser cuidadosamente investigadas. A adsorção de proteínas em IMAC é influenciada por diversos fatores, dentre eles, tipo de metal imobilizado, agente quelante, densidade de ligantes, temperatura, tamanho da proteína, pH, força iônica e tipo de tampões utilizados nas etapas de adsorção e dessorção.

O primeiro passo desse trabalho foi selecionar os íons metálicos a serem imobilizados no agente quelante IDA. Em IMAC, Fe^{3+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Al^{3+} e Ca^{2+} são os íons metálicos mais comumente utilizados [SULKOWSKI, 1989]. Como IgG é uma glicoproteína, contendo vários resíduos de histidina acessíveis, os íons metálicos Fe^{3+} e Al^{3+} não são muito adequados para a sua purificação, uma vez que estes metais ligam-se a fosfato e fosfoésteres primários, oferecendo, dessa forma, a possibilidade de serem utilizados para separar fosfoproteínas (ANDERSSON e PORATH, 1986; SULKOWSKI, 1988). O íon Ca^{2+} coordena o átomo de oxigênio presente no grupo carboxílico dos resíduos dos aminoácidos aspartato e glutamato da molécula, podendo ser utilizado para purificação de proteínas que contenham vários grupos carboxílicos próximos (MANTOVAARA et al., 1991).

Selecionou-se, para a separação de IgG, os íons metálicos Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} e Co^{2+} pois estudos realizados por diversos pesquisadores com proteínas modelos comprovaram a forte afinidade destes metais pelos resíduos histidina acessíveis da proteína (SULKOWSKI, 1988, SULKOWSKI, 1989; ZHAO et al., 1991).

O segundo passo foi selecionar as condições de adsorção e dessorção de IgG. Foram escolhidos três diferentes sistemas tamponantes, a fim de estudar a influência destes na retenção de IgG nas matrizes IMAC: MMA (tampão zwiteriônico), Fosfato e Acetato (tampões que atuam como competidores fracos), e Mops contendo imidazol (tampões que atuam como competidores fortes). Com intuito de impedir interações eletrostáticas, e aumentar a seletividade e estabilidade das ligações metal-proteína, adicionou-se 1M de NaCl nos tampões de adsorção e dessorção [SULKOWSKI, 1985].

4.1.1. Verificação do desprendimento do metal na coluna

Alguns pesquisadores criticam o emprego de IMAC para a purificação de proteínas a serem utilizadas para fins terapêuticos. Esta crítica fundamenta-se na existência da possibilidade de ocorrer desprendimento do metal durante a cromatografia, contaminando a proteína de interesse. Por este motivo, análises foram realizadas com a finalidade de verificar se os tampões que seriam empregados nas etapas de adsorção e eluição (nos seus respectivos pHs) provocariam o desprendimento do metal quelatado.

Os íons metalicos selecionados, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} e Co^{2+}, apresentam uma coloração característica, respectivamente, azul, verde, incolor e rosa. Esta coloração pode ser visualizada na coluna, após o carregamento destes íons.

O desprendimento dos íons metálicos das colunas carregadas foi realizado através de medidas espectrofotométricas (para o Cu^{2+}, Ni^{2+} e Co^{2+}) e por titulação (para o Zn^{2+}) com as amostras do eluente coletadas após a lavagem da coluna com o tampões de adsorção (pH 7,0) e com os tampões de dessorção (pH 4,0).

Verificou-se a partir das análises espectrofotométrica e titulação, que não houve desprendimento dos íons metálicos Cu^{2+}, Ni^{2+} e Zn^{2+}, quando em presença dos tampões estudados. Para o íon metálico Co^{2+}, observou-se visualmente o desprendimento de metal durante a etapa de lavagem com tampão MMA a pH 4,0 (branqueamento em uma grande área da coluna), tendo sido confirmado através de análises espectrofotométricas a 511 nm.

Dessa forma, não foi possível a realização dos experimentos com eluição por abaixamento de pH para este íon metálico, havendo a necessidade de eluir a pH 7,0. Optou-se em eluir a proteína utilizando gradiente crescente da concentração de agentes competidores, tais como Tris e imidazol.

4.2. Influência dos tampões e dos íons metálicos imobilizados na retenção de IgG

4.2.1. Sistema tamponante MMA

Cromatografias com IgG pura foram realizadas com MMA (Mops, Mes e Acetato) contendo 1 M de NaCl a pH 7,0 na etapa da adsorção e MMA contendo 1 M de NaCl a pH 6,0; 5,0 e 4,0 na etapa da eluição. EDTA a 50 mM foi empregado para regenerar a coluna. Os cromatogramas típicos obtidos de experimentos realizados com os íons metálicos Cu^{2-}, Ni^{2-} e Zn^{2+} imobilizados são apresentados nas Figuras 4.1, 4.2 e 4.3. As quantidades e as porcentagens de IgG obtidas em cada fração, para cada íon metálico estudado são apresentadas na Tabela 5.

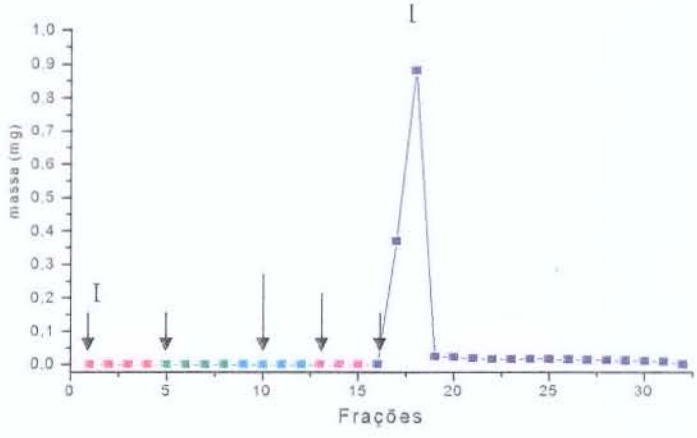

Figura 4.1: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Cu^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, MMA 50 mM contendo 1M NaCl a pH 7,0 (■); tampões de dessorção, MMA 50 mM contendo 1M NaCl a pH 6,0 (■); 5,0 (■) e 4,0 (■); solução de regeneração EDTA a 50 mM (■); vazão 0,5 ml/min; frações de 4 ml recolhidas. A seta I indica injeção da amostra, as demais setas indicam as etapas de troca de tampões de eluição. O número 1 indica o pico de proteína obtido.

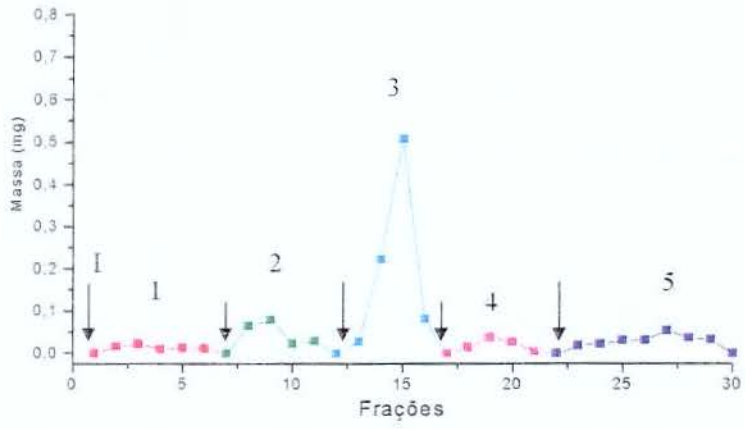

Figura 4.2: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Ni^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, MMA 50 mM contendo 1M de NaCl a pH 7 (■); tampões de dessorção, MMA 50 mM contendo 1M NaCl a pH 6,0 (■); 5,0 (■) e 4,0 (■); solução de regeneração EDTA a 50 mM (■); vazão 0,5 ml/min; frações de 4 ml recolhidas. A seta I indica injeção da amostra, as demais setas indicam as etapas de troca de tampões de eluição. Os números de 1 a 5 indicam os picos de proteína obtidos.

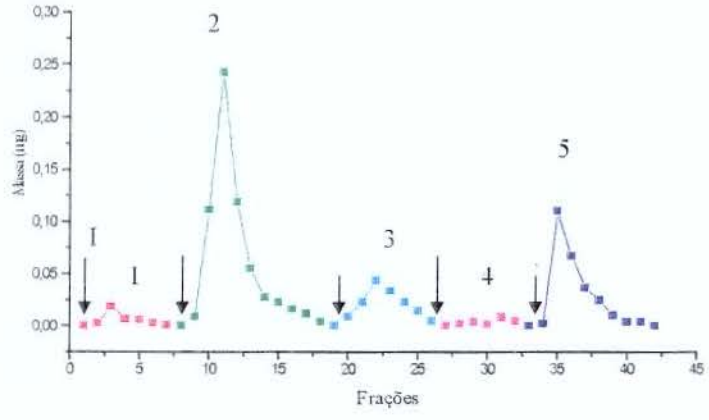

Figura 4.3: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Zn^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, MMA 50 mM contendo 1M NaCl a pH 7,0 (■); tampões de dessorção, MMA 50 mM contendo 1M NaCl a pH 6,0 (■); 5,0 (■) e 4,0 (■); solução de regeneração EDTA a 50 mM (■); vazão 0,5 ml/min;. frações de 4 ml recolhidas. A seta I indica injeção da amostra, as demais setas indicam as etapas de troca de tampões de eluição. Os números de 1 a 5 indicam os picos de proteína obtidos.

Tabela 5: **Ensaios de adsorção e de dessorção de IgG utilizando tampão MMA.**

Íon Metálico	Injeção		Lavagem pH 7		Eluição pH 6		Eluição pH 5		Eluição pH 4		Regeneração EDTA		Recuperação	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Cu^{2+}	1,51	100	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	1,49	98,7	1,49	98,7
Ni^{2+}	1,44	100	0,07	5,1	0,19	13,9	0,84	59,2	0,08	5,8	0,23	15,9	1,43	99,3
Zn^{2+}	1,17	100	0,04	3,4	0,62	57,2	0,15	14,0	0,02	1,7	0,26	23,7	1,08	92,3

Através dos resultados de adsorção de IgG humana pura utilizando tampão MMA, observa-se que IgG foi fortemente adsorvida no íon metálico Cu^{2+} e somente na etapa de regeneração realizada com EDTA a mesma foi eluída. IgG apresentou uma menor afinidade pelo íon metálico Ni^{2+}, pois uma grande parte foi eluída a pH 5,0 (59,2%). O mesmo aconteceu no caso do íon metálico Zn^{2+}, onde a eluição de IgG foi maior a pH 6,0 (57,2%).

4.2.2. Sistemas tamponantes Fosfato e Acetato

O tampão Fosfato atua como competidor fraco pela proteína em IMAC. A influência deste tampão na adsorção e acetato na eluição foi estudada, e os cromatogramas típicos obtidos para os íons metálicos Cu^{2+}, Ni^{2+} e Zn^{2+} são apresentados nas Figuras 4.4, 4.5 e 4.6. As quantidades e as porcentagens de IgG obtidas em cada fração, para cada íon metálico estudado são apresentadas na Tabela 6.

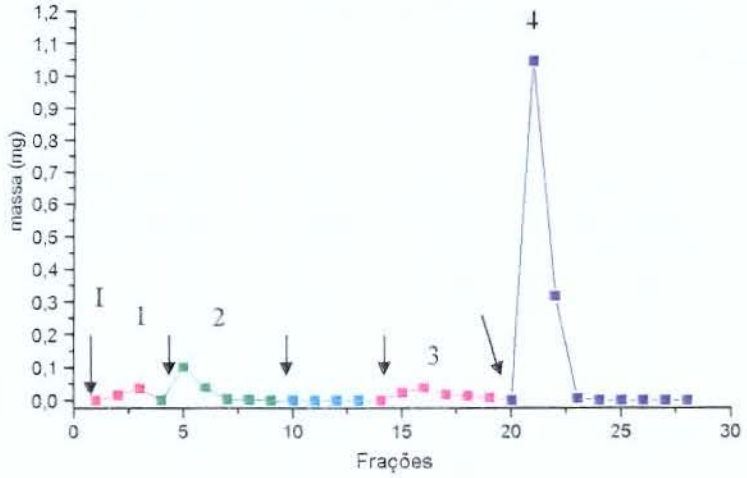

Figura 4.4: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Cu^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Fosfato 50 mM contendo 1M NaCl a pH 7,0 (■); tampões de dessorção, Fosfato 50 mM contendo 1M NaCl a pH 6,0 (■), e Acetato 0,1M a pH 5,0 (■) e 4,0 (■); solução de regeneração EDTA a 50 mM (■); vazão 0.5 ml/min; frações de 4 ml recolhidas. A seta I indica injeção da amostra, as demais setas indicam as etapas de troca de tampão. Os números de 1 a 4 indicam os picos de proteína obtidos.

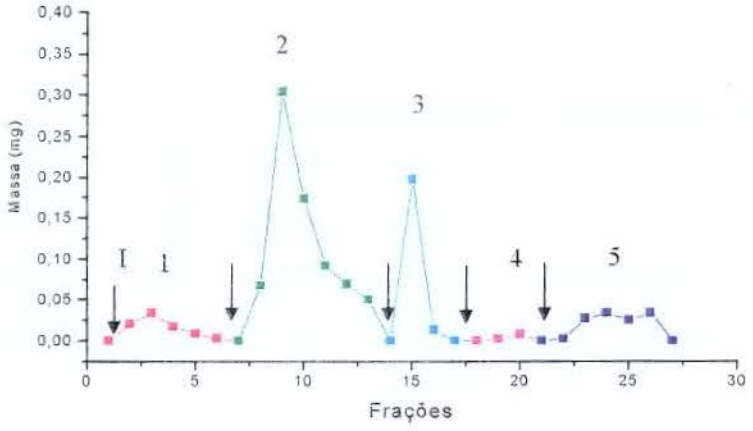

Figura 4.5: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Ni^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Fosfato 50 mM contendo 1M NaCl a pH 7,0 (■); tampões de dessorção, Fosfato 50 mM contendo 1M NaCl a pH 6,0 (■), e Acetato 0,1M a pH 5,0 (■) e 4,0 (■); solução de regeneração EDTA a 50 mM (■); vazão 0.5 ml/min;. frações de 4 ml recolhidas. A seta I indica injeção da amostra, as demais setas indicam as etapas de troca de tampão. Os números de 1 a 5 indicam os picos de proteína obtidos.

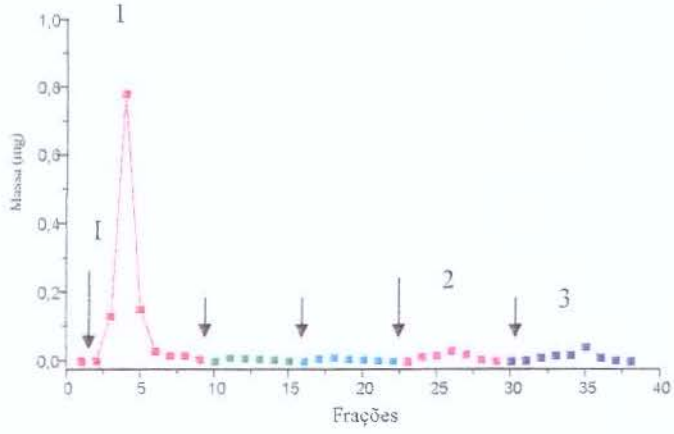

Figura 4.6: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Zn^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem. Fosfato 50 mM contendo 1M NaCl a pH 7,0 (■); tampões de dessorção. Fosfato 50 mM contendo 1M NaCl a pH 6,0 (■), e Acetato 0,1M a pH 5,0 (■) e 4,0 (■); solução de regeneração EDTA a 50 mM (■); vazão 0,5 ml/min; frações de 4 ml recolhidas. A seta I indica injeção da amostra, as demais setas indicam as etapas de troca de tampão. Os números de 1 a 3 indicam os picos de proteína obtidos.

Tabela 6: **Ensaios de adsorção e de dessorção de IgG utilizando tampões Fosfato e Acetato, respectivamente.**

Íon Metálico	Injeção		Lavagem pH 7		Eluição pH 6		Eluição pH 5		Eluição PH 4		Regeneração EDTA		Recuperação	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Cu^{2+}	1,74	100	0,06	3,3	0,15	9,0	0,00	0,0	0,10	6,3	1,37	81,4	1,69	97,1
Ni^{2+}	1,25	100	0,08	7,0	0,76	63,5	0,21	17,7	0,02	1,5	0,12	10,3	1,19	95,2
Zn^{2+}	1,41	100	1,13	81,7	0,03	2,2	0,04	2,6	0,08	6,1	0,10	7,3	1,38	97,9

Através dos resultados de adsorção de IgG, observa-se que esta proteína foi fortemente adsorvida no íon metálico Cu^{2+}, e somente na etapa de regeneração com EDTA a mesma foi quase toda eluída (81,4%). IgG apresentou uma menor afinidade pelo íon metálico Ni^{2+}, grande parte foi eluída a pH 6 (63,5%). Já para o íon metálico Zn^{2+}, 81,7% da IgG injetada não foi adsorvida, tendo sido eliminada durante a etapa de lavagem.

4.2.3. Sistema tamponante Mops contendo imidazol

Imidazol atua como competidor forte pelo sítio de ligação da proteína em IMAC. A influência deste agente foi estudada e os cromatogramas típicos obtidos de experimentos realizados com os íons metálicos Cu^{2+}, Ni^{2+} e Zn^{2+} imobilizados são apresentados nas Figuras 4.7, 4.8 e 4.9. As quantidades e as porcentagens de IgG obtidas em cada fração, para cada íon metálico estudado são apresentadas na Tabela 7.

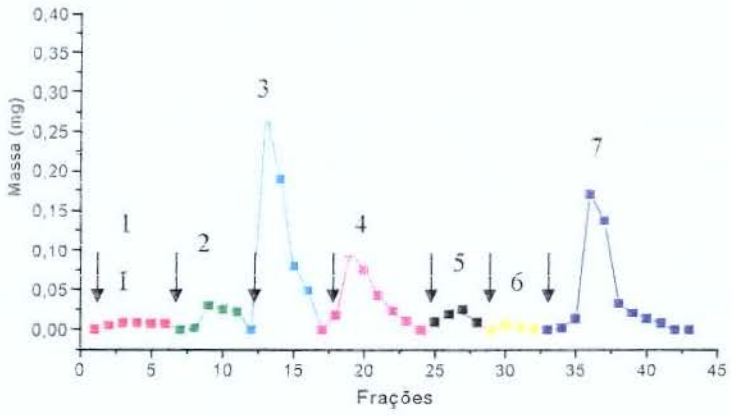

Figura 4.7: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Cu^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Mops contendo 1 M NaCl e 2mM de imidazol a pH 7,0 (■); tampões de dessorção, Mops contendo 1 M NaCl e 10 (■), 20(■), 30 (■), 50 (■) e 100 (■) mM de imidazol a pH 7; solução de regeneração EDTA a 50 mM (■); vazão 0,5 ml/min; frações de 4 ml recolhidas. A seta I indica injeção da amostra, as demais setas indicam as etapas de troca de tampão. Os números de 1 a 7 indicam os picos de proteína obtidos.

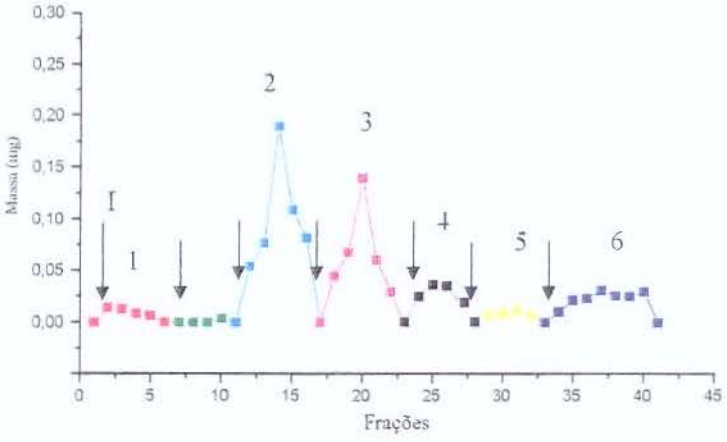

Figura 4.8: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-6B com o íon Ni^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Mops contendo 1 M de NaCl e 2 mM de imidazol a pH 7,0 (■); tampões de dessorção, Mops contendo 1 M NaCl e 10 (■), 20 (■), 30 (■), 50 (■) e 100 (■) mM de imidazol a pH 7; solução de regeneração EDTA a 50 mM (■); vazão 0,5 ml/min; frações de 4 ml recolhidas. A seta I indica injeção da amostra, as demais setas indicam as etapas de troca de tampão. Os números de 1 a 6 indicam os picos de proteína obtidos.

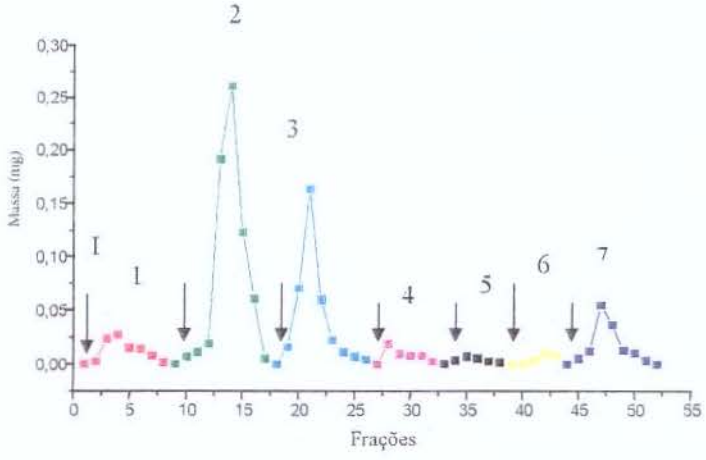

Figura 4.9: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Zn^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Mops contendo 1 M de NaCl e 2mM de imidazol a pH 7,0 (■); tampões de dessorção, Mops contendo 1 M NaCl e 10 (■), 20 (■), 30 (■), 50 (■) e 100 (■) mM de imidazol a pH 7; solução de regeneração EDTA a 50 mM (■); vazão 0,5 ml/min; frações de 4 ml recolhidas. A seta I indica injeção da amostra, as demais setas indicam as etapas de troca de tampão. Os números de 1 a 7 indicam os picos de proteína obtidos.

Tabela 7: **Ensaios de adsorção e de dessorção de IgG utilizando tampão Mops contendo imidazol.**

Íon Metálico	Injeção		Lavagem (2mM)		Eluição (10mM)		Eluição (20mM)		Eluição (30mM)		Eluição (50mM)		Eluição (100mM)		Regeneração EDTA		Recuperação	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Cu^{2+}	1,28	100	0,01	0,8	0,08	7,0	0,48	40,5	0,26	21,9	0,05	4,3	0,01	1,0	0,28	24,5	1,17	91,4
Ni^{2+}	1,24	100	0,04	3,5	0,00	0,0	0,51	42,2	0,34	28,2	0,11	9,2	0,03	2,8	0,17	13,7	1,21	97,6
Zn^{2+}	1,41	100	0,09	6,7	0,68	50,3	0,36	26,3	0,05	3,5	0,02	1,5	0,02	1,5	0,14	10,1	1,35	95,7

Através dos resultados de adsorção de IgG utilizando tampão Mops contendo imidazol, observa-se para o íon metálico Cu^{2+} eluição de grande parte de IgG injetada quando se utilizou 20 mM de imidazol (40,5%), bem como para Ni^{2+} (42,2%). Já para o íon metálico Zn^{2+}, a eluição de IgG foi maior a 10 mM de imidazol (50,3%).

4.2.4. Íon Co^{2+}: Solução tamponante Tris-HCl e Mops contendo imidazol

Devido ao desprendimento do íon metálico Co^{2+} observado nos experimentos por decréscimo de pH, fez-se necessário usar agentes competidores a pH neutro para eluir IgG. A influência de dois agentes competidores (imidazol e Tris) em soluções tamponantes foi estudada e os cromatogramas típicos obtidos de experimentos realizados com o íon metálicos Co^{2+} imobilizado são apresentados nas Figuras 4.10 e 4.11. As quantidades e as porcentagens de IgG obtidas em cada fração, para o íon metálico Co^{2+} são apresentadas na Tabela 8 e 9.

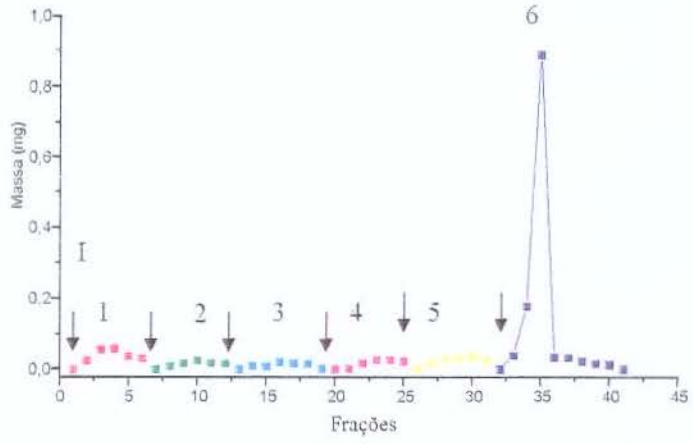

Figura 4.10: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Co^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, 25 mM de Tris-HCl a pH 7,0 (■); tampões de dessorção: 50 (■), 100 (■), 150 (■) e 200 (■) mM de Tris-HCl a pH 7; solução de regeneração EDTA a 50 mM (■), vazão 0,5 ml/min; frações de 4 ml recolhidas. A seta I indica injeção da amostra, as demais setas indicam as etapas de troca de tampão. Os números de 1 a 6 indicam os picos de proteína obtidos.

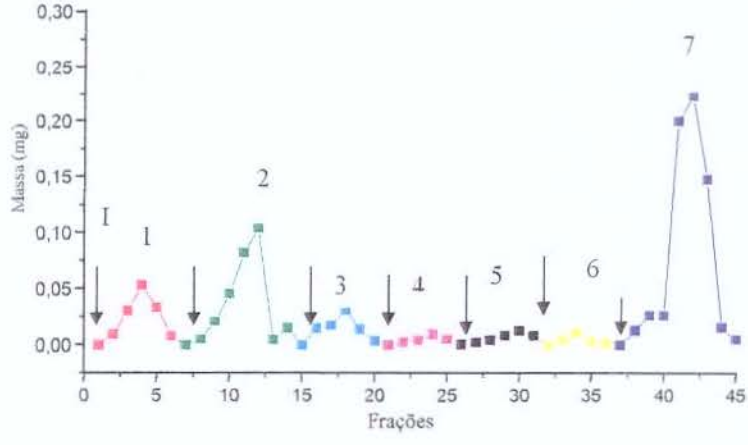

Figura 4.11: Cromatografia de IgG pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Co^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Mops contendo 1 M de sal NaCl e 2mM de imidazol a pH 7,0 (■); tampões de dessorção, Mops contendo 1 M NaCl e 10 (■), 20 (■), 30 (■), 50 (■) e 100 (■) mM de imidazol a pH 7; solução de regeneração EDTA a 50 mM (■); vazão 0,5 ml/min; frações de 4 ml recolhidas. A seta I indica injeção da amostra, as demais setas indicam as etapas de troca de tampão. Os números de 1 a 7 indicam os picos de proteína obtidos.

Tabela 8: **Ensaio de adsorção e de dessorção de IgG utilizando tampão Tris-HCl.**

Íon metálico	Injeção		Lavagem (25mM)		Eluição (50mM)		Eluição (100mM)		Eluição (150mM)		Eluição (200mM)		Regeneração EDTA		Recupera-ção	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Co^{2+}	1,83	100	0,21	1 1,4	0,08	4,6	0,07	4,0	0,09	5,2	0,14	7,5	1,22	67,3	1,82	99,5

Tabela 9: **Ensaio de adsorção e de dessorção de IgG utilizando tampão Mops contendo imidazol.**

Íon metálico	Injeção		Lavagem (2mM)		Eluição (10mM)		Eluição (20mM)		Eluição (30mM)		Eluição (50mM)		Eluição (1000mM)		Regeneração (EDTA)		Regenera-ção	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Co^{2+}	1,25	100	0,13	10,9	0,28	22,7	0,08	6,6	0,02	1,6	0,03	2,7	0,02	1,6	0,66	53,6	1,22	97,6

Através dos resultados de adsorção de IgG utilizando íon metálico Co^{2+}, observa-se para tampão Tris-HCl, que IgG foi fortemente adsorvida no íon metálico Co^{2+}, uma vez que grande quantidade de IgG foi eluída durante a regeneração da coluna com EDTA (67,3%). Já para o tampão Mops contendo imidazol, IgG foi eluída a 10 mM de imidazol (22,7%), e grande quantidade eluída com EDTA (53,6%), mostrando que os dois agentes competidores utilizados nas soluções tampontes, proporcionaram grande retenção de IgG por este íon metálico estudado.

4.3. Análise dos resultados das cromatografias utilizando IgG pura

Diversos perfis cromatográficos de IgG foram observados nos estudos com diferentes tampões e íons metálicos imobilizados. Dentre os íons metálicos estudados Pode-se observar que a afinidade de IgG pelo íon metálico Cu^{2+} foi a maior em comparação aos outros íons. A proteína foi fortemente adsorvida em Cu^{2+} imobilizado e somente na etapa de regeneração a mesma foi eluída, juntamente com o íon metálico. IgG apresentou uma menor afinidade pelos íons metálicos Ni^{2+} e Zn^{2+} que por Cu^{2+}, uma vez que a eluição da proteína foi possível através de gradiente descontínuo de pH e por competição com

imidazol. Para os íons metálicos Ni^{2+} e Zn^{2+}, os resultados cromatográficos utilizando tampão MMA demonstraram que uma grande porcentagem de IgG foi eluída a pH 5,0 para o íon metálico Ni^{2+} e a pH 6,0 para o íon metálico Zn^{2+}. Quando tampão Fosfato foi utilizado, IgG apresentou pouca afinidade pelo íon metálico Ni^{2+}, uma vez que a mesma foi eluída a pH 6. Já para o íon metálico Zn^{2+}, 81,7% da proteína injetada não foi adsorvida, tendo sido eliminada durante a etapa de lavagem (pH 7,0), demonstrando, dessa forma, praticamente nenhuma afinidade pelo íon Zn^{2+} em presença desse tampão. Para o tampão Mops contendo imidazol a afinidade de IgG pelo metal Zn^{2+} foi menor em comparação ao íon metálico Ni^{2+}.

Os resultados das eluições por competição utilizando tampão Mops contendo imidazol em colunas IDA-Co^{2+} mostraram que IgG apresentou uma afinidade maior que para os íons metálicos Cu^{2+}, Ni^{2+} e Zn^{2+}. Os resultados obtidos indicaram que Tris-HCl é um agente competidor mais fraco que imidazol, além da afinidade de IgG pelo íon Co^{2+} ser mais forte neste sistema tamponante Tris-HCl.

SULKOWSKI, 1989 mostrou que a força de retenção das proteínas em colunas IDA-Me^{2+} segue a ordem: $Cu^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} \geq Co^{2+}$ em tampão fosfato a 20 mM contendo 1 M NaCl a pH 7,0. Os resultados obtidos a partir de experimentos de adsorção de IgG em presença de tampão fosfato e MMA concordam, em termos de força de retenção, com aqueles demonstrados por SULKOWSKI, 1989. No entanto, quando a adsorção de IgG em colunas IDA-Me^{2+} foi realizada em tampão Mops contendo 2 mM de imidazol, a força de retenção não seguiu a ordem estabelecida por SULKOWSKI, tendo-se observado uma retenção maior de IgG em colunas IDA-Co^{2+}, seguido por IDA-Cu^{2+}, IDA-Ni^{2+} e IDA-Zn^{2+}.

Estudos de adsorção de proteínas em matrizes IMAC indicaram que adsorventes com agente quelante IDA preparados com Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+} são fortemente seletivos pelos resíduos de histidina acessíveis nas proteínas, mas podem também ligar-se com resíduos cisteína e triptofano [HEMDAN e PORATH, 1985; BELEW e PORATH, 1990]. A afinidade do triptofano por esses metais imobilizados é mais fraca que por histidina e a presença de resíduos triptofano acessíveis pode alterar a afinidade total da proteína pelo íon metálico imobilizado através de formação de ligações de coordenação ou influenciando a interação entre o íons metálico imobilizado e o nitrogênio do anel imidazol de histidina. [SULKOWSKI, 1989; BELEW e PORATH, 1990; CHICZ e REGNIER, 1989]. Assim, pode ser que a presença de resíduos triptofano acessíveis estejam, em presença de tampão

Mops contendo 2 mM imidazol, influenciando fortemente a retenção de IgG em colunas IDA-Co^{2+}, de forma que força de retenção de IgG neste metal seja maior que nos outros metais estudados.

A imunoglobulina G humana utilizada nesse trabalho por ser policlonal, apresenta quatro subclasses e vários pontos isoelétricos. Estas proteínas podem apresentar diferentes afinidades pelos íons metálicos imobilizados. Este fato explica as diferentes porcentagens de IgG obtidas nas frações de lavagem e eluição, para cada tampão e íon metálico estudado. Assim, métodos específicos de separação de proteínas podem ser conduzidos pela escolha do metal e solução tamponante, pois diferentes interações entre proteína e metal podem ser averiguadas conforme a solução tamponante empregada.

Baseado nos resultados obtidos, selecionamos o íon metálico Ni^{2+} para testar a seletividade do suporte em purificar IgG a partir do plasma humano, uma vez que a quantidade de IgG adsorvida no suporte e obtida na etapa de dessorção foi significativa, possibilitando maior seletividade em relação aos outros íons metálicos estudados.

4.4. Influência da solução tamponante na adsorção de IgG a partir do plasma humano

Testes com plasma humano foram realizados para verificar a seletividade da matriz IDA-Ni^{+2} em adsorver IgG. Utilizou-se, para esses experimentos, os mesmos tampões empregados nos experimentos com IgG humana pura. As proteínas foram eluídas por supressão das ligações de coordenação entre metal e a proteína (através de um gradiente descrecente de pH) ou utilizando um agente competidor (gradiente crescente da concentração de imidazol). Os cromatogramas típicos obtidos para o íon metálico Ni^{2+} utilizando tampões MMA, Fosfato e Acetato, e Mops contendo imidazol são apresentados nas Figuras 4.12, 4.13 e 4.14. As quantidades e as porcentagens de proteínas totais do plasma humano obtidas em cada fração utilizando íon metálico Ni^{2+} são apresentadas na Tabela 10 e 11.

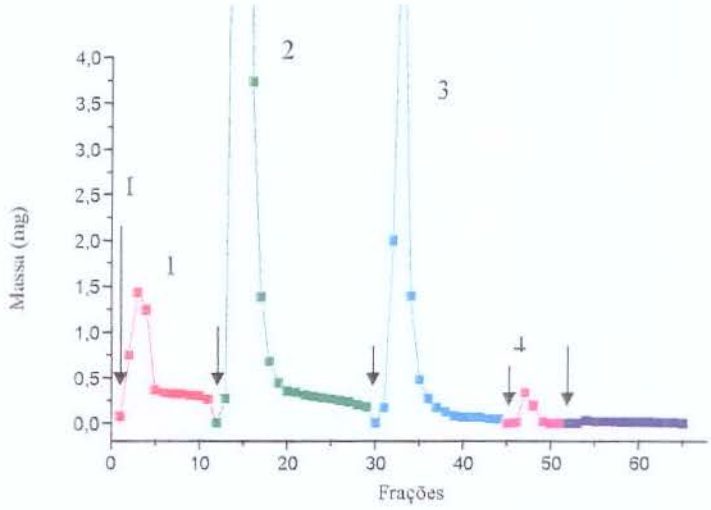

Figura 4.12: Cromatografia de IgG purificada a partir do plasma humano em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Ni^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, 50 mM de MMA contendo 1M NaCl a pH 7,0 (■); tampões de dessorção, MMA 50 mM contendo 1M NaCl a pH 6,0 (■); 5,0 (■) e 4,0 (■); solução de regeneração EDTA a 50 mM (■); vazão 0,5 ml/min; frações de 4 ml recolhidas. A seta I indica injeção da amostra, as demais setas indicam as etapas de troca de tampão. Os números de 1 a 4 indicam os picos de proteína obtidos.

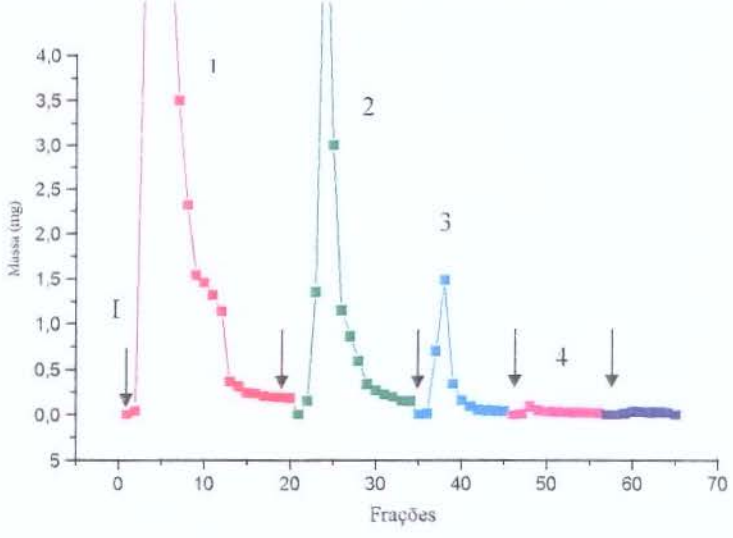

Figura 4.13: Cromatografia de IgG purificada a partir do plasma humano em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Ni^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Fosfato 50 mM contendo 1M NaCl a pH 7,0 (■); tampões de dessorção, Fosfato 50 mM contendo 1M NaCl a pH 6,0 (■), e Acetato 0,1M a pH 5,0 (■) e 4,0 (■); solução de regeneração EDTA a 50 mM (■); vazão 0,5 ml/min; frações de 4 ml recolhidas. A seta I indica injeção da amostra, as demais setas indicam as etapas de troca de tampão. Os números de 1 a 4 indicam os picos de proteína obtidos.

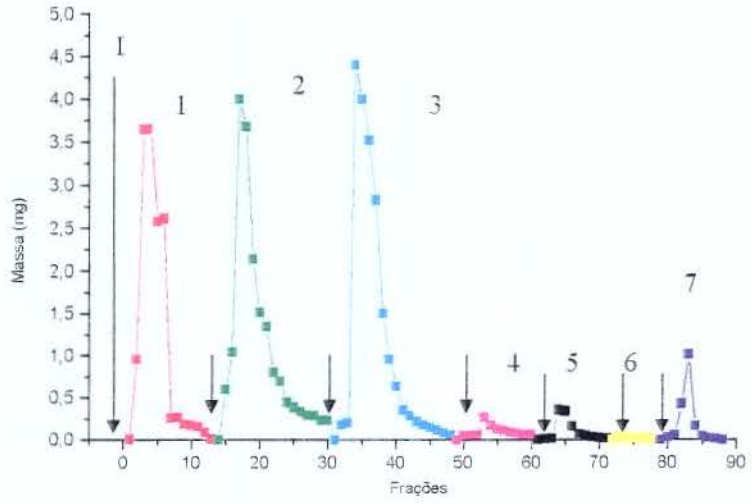

Figura 4.14: Cromatografia de IgG purificada a partir do plasma humano pura em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Ni^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Mops contendo 1 M de NaCl e 2mM de imidazol a pH 7 (■); tampões de dessorção, Mops contendo 1 M NaCl e 10 (■), 20 (■), 30 (■), 50 (■) e 100 (■) mM de imidazol a pH 7; solução de regeneração EDTA a 50 mM (■); vazão 0,5 ml/min; frações de 4 ml recolhidas. A seta I indica injeção da amostra, as demais setas indicam as etapas de troca de tampão. Os números de 1 a 7 indicam os picos de proteína obtidos.

Tabela 10: **Balanço de massa das poteínas totais do plasma humano, após a cromatografia, com dessorção por gradiente decrescente de pH.**

Sistema tamponante	Injeção		Lavagem pH 7		Eluição pH 6		Eluição pH 5		Eluição pH 4		Regeneração EDTA		Recuperação	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
MMA	70,22	100	5,76	10,1	39,37	68,9	11,25	19,7	0,57	1,0	0,18	0,3	57,14	81,4
Fosfato e Acetato	71,77	100	56,29	76,2	14,88	20,1	2,54	3,4	0,09	0,0	0,10	0,1	73,9	103,0

Tabela 11: **Balanço de massa das poteínas totais do plasma humano, após a cromatografia, com dessorção por gradiente crescente da concentração de imidazol.**

Sistema tampo-nante	Injeção		Lavagem (2mM)		Eluição (10mM)		Eluição (20mM)		Eluição (30mM)		Eluição (50mM)		Eluição (100mM)		Regeneração EDTA		Recupe-ração	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Mops contendo imidazol	62,00	100	14,65	25,8	18,04	31,7	19,7	34,7	1,25	2,2	1,34	2,4	0,10	0,2	1,77	3,1	56,85	91,7

Através dos resultados de adsorção das proteínas do plasma humano em IDA-Ni^{2+}, observa-se para o tampão MMA a pH 6,0 o enfraquecimento das ligações entre proteína-Ni^{2+}, eluindo 68,9% das proteínas do plasma. Para tampões Fosfato e Acetato ocorreu uma fraca retenção das proteínas, tendo sido eliminadas 76,2% durante a etapa de lavagem a pH 7,0. Já para tampão Mops contendo imidazol, em várias concentrações do agente competidor as proteínas foram eluídas; a 2mM de imidazol (25,8%), a 10 mM de imidazol (31,7%) e a 20 mM de imidazol (34,7%).

Com as frações coletadas nas etapas de lavagem e eluição das cromatografias, foi realizada eletroforese SDS-PAGE visando constatar a presença de bandas de interesse na região próxima a 50 kDa e 25 kDa (massa molecular da cadeia pesada e leve de IgG) e também avaliar a presença de contaminantes. Os géis de eletroforese são mostrados nas Figuras 4.15, 4.16 e 4.17, obtidos a partir dos ensaios cromatográficos representados respectivamente nas Figuras 4.12, 4.13 e 4.14.

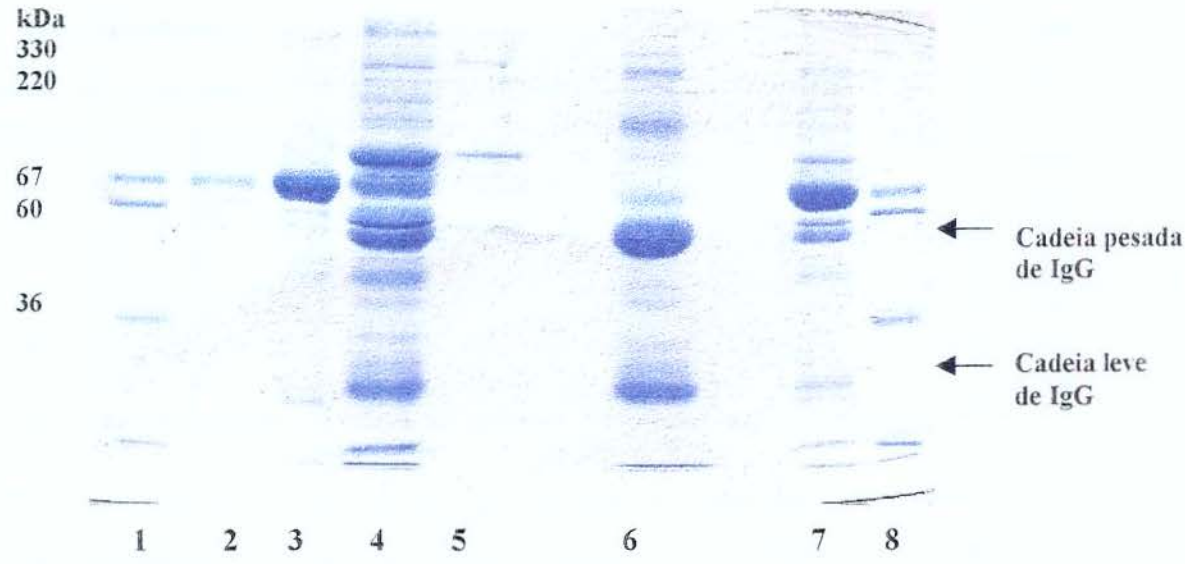

Figura 4.15: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com coomassie brilliant blue. Tempo de migração aproximadamente 7 horas. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando o íon metálico Ni^{2+}, e tampão MMA 0,05M contendo 1 M de NaCl (pH 7, 6, 5 e 4). Faixa 1: marcador de alta massa molecular; faixa 2: frações de lavagem (pH 7); faixa 3: frações de eluição (pH 6); faixa 4: frações de eluição (pH 5); faixa 5: frações de eluição (pH 4); faixa 6: IgG humana (Sigma), 2 mg/ml; faixa 7: plasma humano 10 mg/ml; faixa 8: marcador de alta massa molecular.

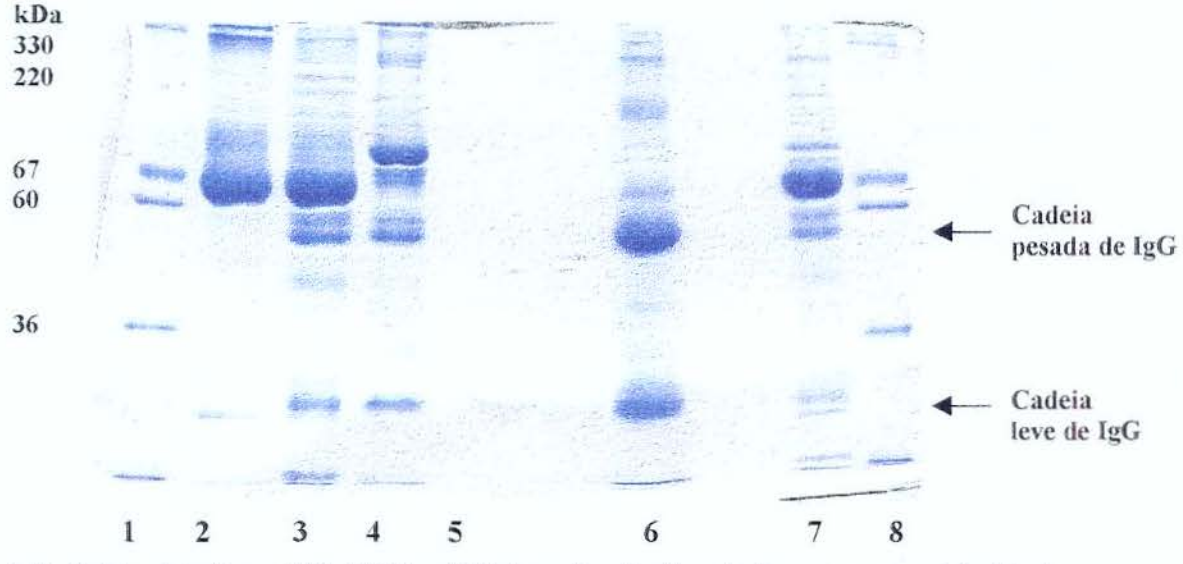

Figura 4.16: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com coomassie brilliant blue. Tempo de migração aproximadamente 7 horas. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando o íon metálico Ni^{2+}, e tampões Fosfato (pH 7 e 6) e Acetato (pH 5 e 4) ambos contendo 1 M de NaCl. Faixa 1: marcador de alta massa molecular; faixa 2: frações de lavagem (pH 7); faixa 3: frações de eluição (pH 6); faixa 4: frações de eluição (pH 5); faixa 5: frações de eluição (pH 4); faixa 6: IgG humana (Sigma), 2 mg/ml; faixa 7: plasma humano 10 mg/ml; faixa 8: marcador de alta massa molecular.

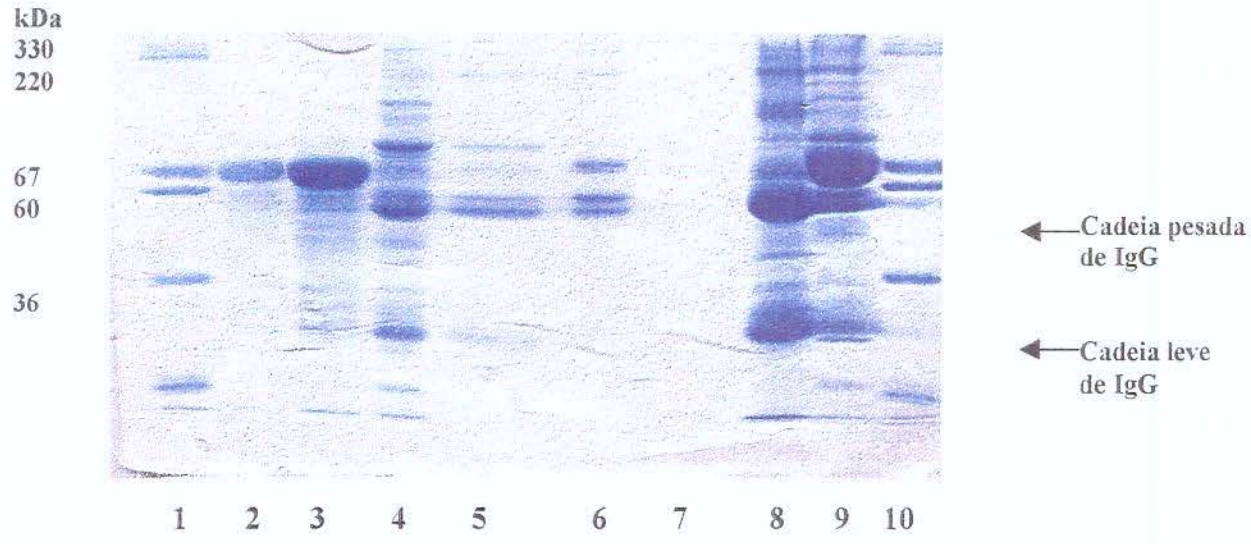

Figura 4.17: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com coomassie brilliant blue. Tempo de migração aproximadamente 7 horas. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando o íon metálico Ni^{2+}, e tampões Mops contendo 1 M de NaCl e 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol a pH 7. Faixa 1: marcador de alta massa molecular; faixa 2: frações de lavagem (2 mM de imidazol); faixa 3: frações de eluição (10 mM de imidazol); faixa 4: frações de eluição (20 mM de imidazol); faixa 5: frações de eluição (30 mM de imidazol); faixa 6: frações de eluição (50 mM de imidazol); faixa 7: frações de eluição (100 mM de imidazol); faixa 8: IgG humana (Sigma), 2 mg/ml; faixa 9: plasma humano 10 mg/ml; faixa 10: marcador de alta massa molecular.

Foram observadas quantidades significativas de proteínas com massa molecular de IgG, em algumas faixas dos géis. Entretanto, a presença de contaminantes (dentre eles albumina) foi relevante em várias faixas, indicando uma seletividade baixa para com IgG nestes ensaios cromatográficos. As faixas com maior concentração de IgG foram a 4 da Figura 4.15, a 3 e 4 da Figura 4.16, e a 4 e 5 da Figura 4.17.

4.5. Influência dos íons metálicos Cu^{2+}, Co^{2+} e Zn^{2+} na adsorção de IgG a partir do plasma humano

Como o íon metálico Ni^{2+} não forneceu purificação expressiva de IgG, devido a relevante presença de contaminantes, decidiu-se testar outros íons metálicos, tais como Cu^{2+}, Co^{2+} e Zn^{2+}. Os experimentos foram conduzidos em tampão Mops contendo imidazol, baseado nos resultados das cromatografias efetuadas com IgG (Sigma), os quais mostraram, neste sistema tamponante, que a proteína foi adsorvida em todos os íon metálicos estudados, apresentando a possibilidade de eluí-la, após a adsorção, através de um gradiente crescente de imidazol. Os cromatogramas para os íons metálicos Cu^{2+}, Co^{2+} e Zn^{2+}, utilizando tampão Mops contendo imidazol são apresentados respectivamente nas Figuras 4.18, 4.19 e 4.20. As quantidades e as respectivas porcentagens de proteína total do plasma humano obtidas nas etapas de adsorção e eluição são apresentadas na Tabela 12.

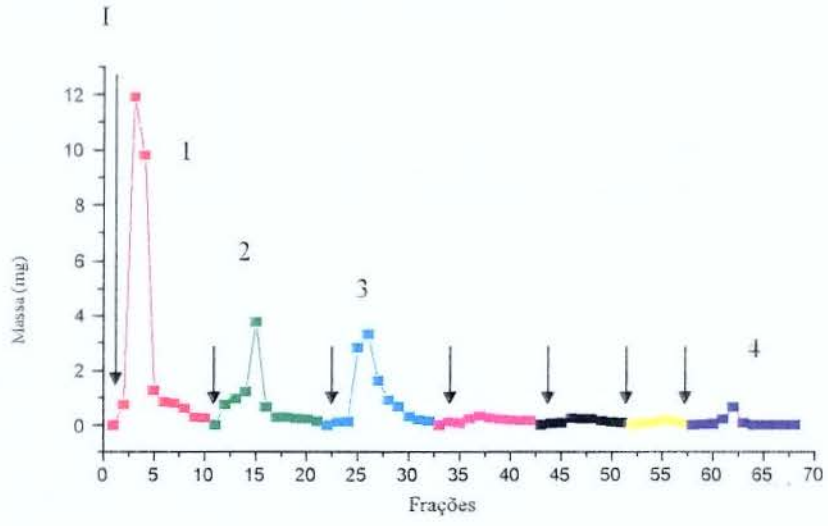

Figura 4.18: Cromatografia de IgG purificada a partir do plasma humano em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Cu^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Mops contendo 1 M de NaCl e 2mM de imidazol a pH 7 (■); tampões de dessorção, Mops contendo 1 M NaCl e 10 (■), 20 (■), 30 (■), 50 (■) e 100 (■) mM de imidazol a pH 7; solução de regeneração EDTA a 50 mM (■); vazão 0,5 ml/min; frações de 4 ml recolhidas. A seta I indica injeção da amostra, as demais setas indicam as etapas de troca de tampão. Os números de 1 a 4 indicam os picos de proteína obtidos.

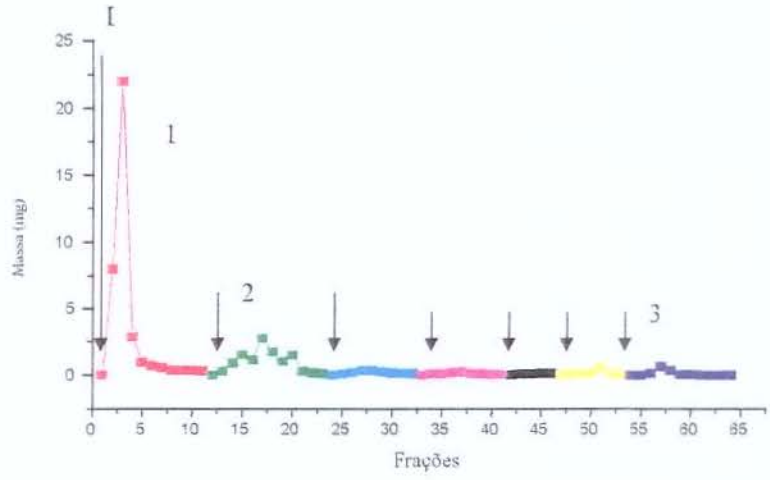

Figura 4.19: Cromatografia de IgG purificada a partir do plasma humano em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Co^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Mops contendo 1 M de NaCl e 2mM de imidazol a pH 7 (■); tampões de dessorção. Mops contendo 1 M NaCl e 10 (■), 20 (■), 30 (■), 50 (■) e 100 (■) mM de imidazol a pH 7; solução de regeneração EDTA a 50 mM (■); vazão 0,5 ml/min; frações de 4 ml recolhidas. A seta I indica injeção da amostra, as demais setas indicam as etapas de troca de tampão. Os números de 1 a 3 indicam os picos de proteína obtidos.

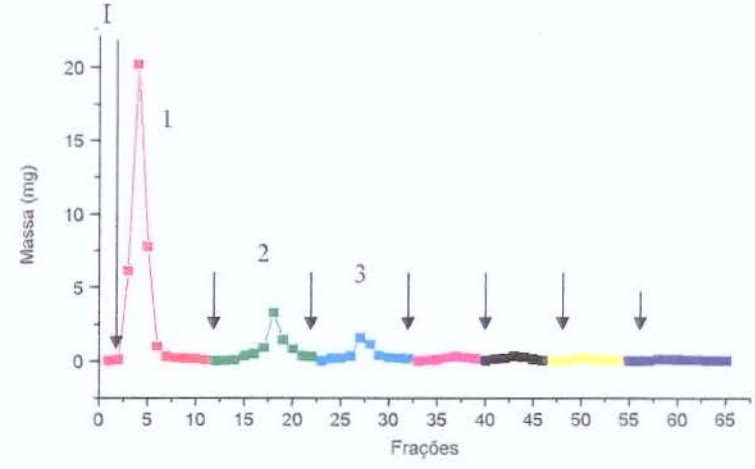

Figura 4.20: Cromatografia de IgG purificada a partir do plasma humano em coluna contendo gel IDA-Sepharose 6B com o íon Zn^{2+} imobilizado. Perfil cromatográfico: tampão de lavagem, Mops contendo 1 M de NaCl e 2mM de imidazol a pH 7 (■); tampões de dessorção. Mops contendo 1 M NaCl e 10 (■), 20 (■), 30 (■), 50 (■) e 100 (■) mM de imidazol a pH 7; solução de regeneração EDTA a 50 mM (■); vazão 0,5 ml/min; frações de 4 ml recolhidas. A seta I indica injeção da amostra, as demais setas indicam as etapas de troca de tampão. Os números de 1 a 3 indicam os picos de proteína obtidos.

Tabela 12: **Balanço de massa das proteínas do plasma humano, após a cromatografia em matrizes IDA-Cu^{2+}, -Co^{2+} e -Zn^{2+}.**

Sistema tamponante	Injeção		Lavagem (2mM)		Eluição (10mM)		Eluição (20mM)		Eluição (30mM)		Eluição (50mM)		Eluição (100mM)		Regeneração EDTA		Recuperação	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Cu^{2+}	54,00	100	26,59	53,1	8,60	17,2	10,28	20,5	1,80	3,6	1,14	2,3	0,57	1,1	1,05	2,1	50,00	92,6
Co^{2+}	54,00	100	36,30	68,5	11,33	21,4	1,71	3,2	1,05	2,0	0,31	0,6	1,07	2,0	1,21	2,3	53,00	98,1
Zn^{2+}	53,83	100	35,96	69,2	7,99	15,4	4,43	8,5	1,20	2,3	0,96	1,8	0,74	1,4	0,71	1,4	51,98	96,6

Através dos resultados apresentados na Tabela 12, observa-se que as proteínas do plasma foram fracamente adsorvidas nestes três íons metálicos utilizados, tendo em vista a porcentagem de proteína obtida na etapa de lavagem (2 mM imidazol) para cada íon metálico empregado, Cu^{2+} (53,1%), Zn^{2+} (69,2%) e Co^{2+} (68,5%).

Com as frações coletadas nas etapas de lavagem e eluição das cromatografias, foi realizada eletroforese SDS-PAGE visando constatar a presença de bandas de interesse na região próxima a 50 kDa e 25 kDa (massa molecular da cadeia pesada e leve de IgG) e também avaliar a presença de contaminantes adsorvidos na matriz IDA-Cu^{2+}, Co^{2+} ou Zn^{2+}. Os géis de eletroforese são mostrados nas Figuras 4.21, 4.22 e 4.23, obtidos a partir dos ensaios cromatográficos representados, respectivamente, nas Figuras 4.18, 4.19, e 4.20.

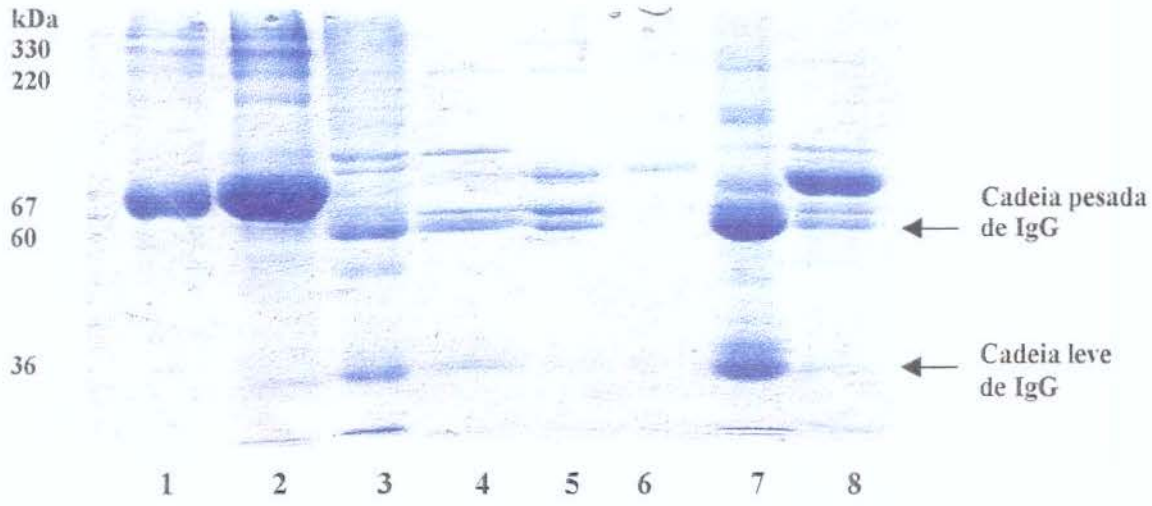

Figura 4.21: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com coomassie brilliant blue. Tempo de migração aproximadamente 7 horas. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando o íon metálico Cu^{2+}, e tampões Mops contendo 1 M de NaCl e 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol a pH 7. Faixa 1: frações de lavagem (2 mM de imidazol); faixa 2: frações de eluição (10 mM de imidazol); faixa 3: frações de eluição (20 mM de imidazol); faixa 4: frações de eluição (30 mM de imidazol); faixa 5: frações de eluição (50 mM de imidazol); faixa 6: frações de eluição (100 mM de imidazol); faixa 7: IgG humana (Sigma), 2 mg/ml; faixa 8: plasma humano 10 mg/ml.

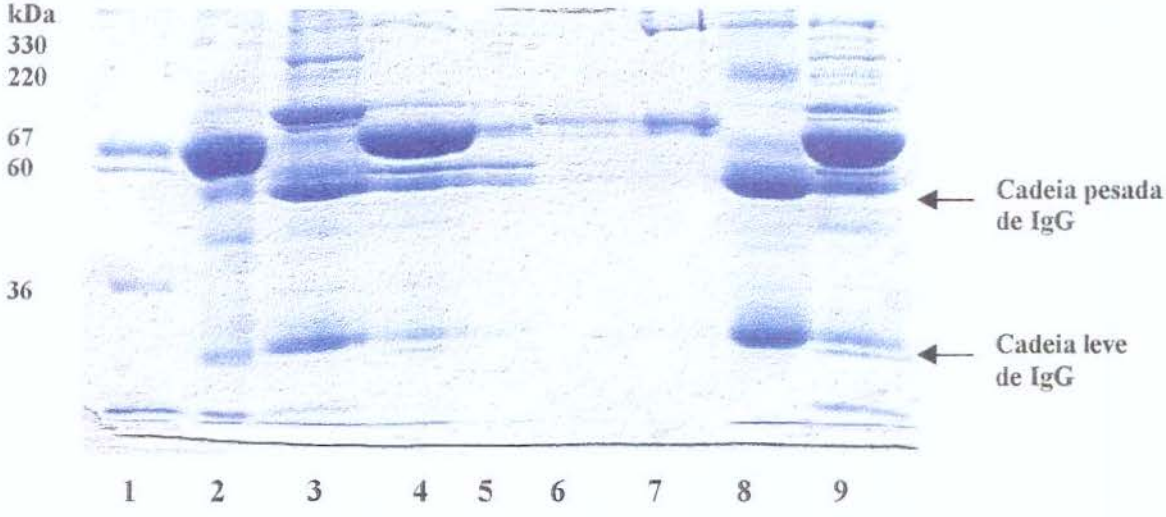

Figura 4.22: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com coomassie brilliant blue. Tempo de migração aproximadamente 7 horas. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando o íon metálico Co^{2+}, e tampões Mops contendo 1 M de NaCl e 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol a pH 7. Faixa 1: marcador de alta massa molecular; faixa 2: frações de lavagem (2 mM de imidazol); faixa 3: frações de eluição (10 mM de imidazol); faixa 4: frações de eluição (20 mM de imidazol); faixa 5: frações de eluição (30 mM de imidazol); faixa 6: frações de eluição (50 mM de imidazol); faixa 7: frações de eluição (100 mM de imidazol); faixa 8: IgG humana (Sigma), 2 mg/ml; faixa 9: plasma humano 10 mg/ml.

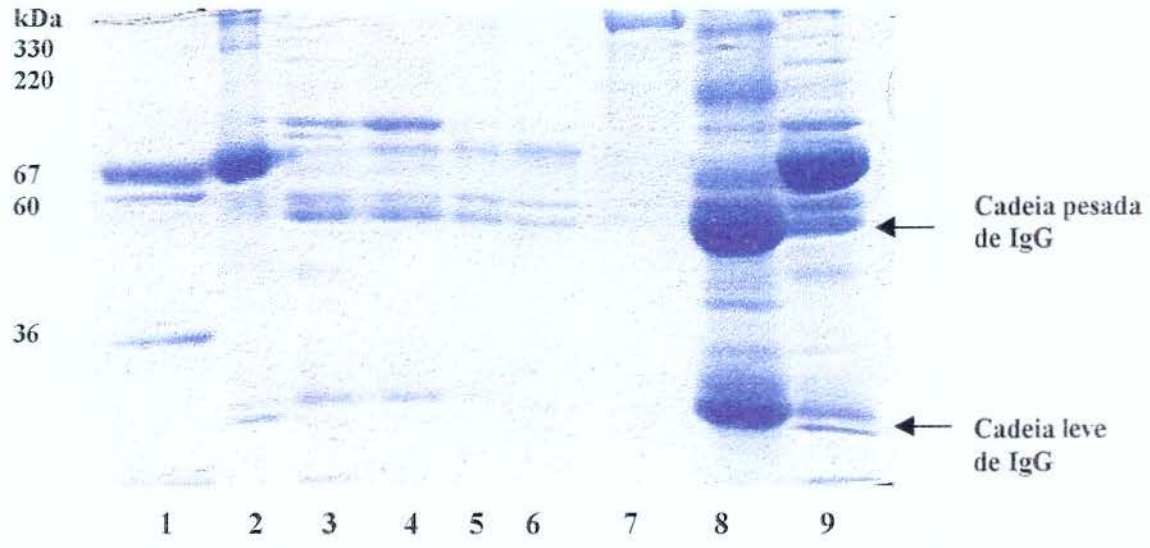

Figura 4.23: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com coomassie brilliant blue. Tempo de migração aproximadamente 7 horas. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando o íon metálico Zn^{2+}, e tampões Mops contendo 1 M de NaCl e 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol a pH 7. Faixa 1: marcador de alta massa molecular; faixa 2: frações de lavagem (2 mM de imidazol); faixa 3: frações de eluição (10 mM de imidazol); faixa 4: frações de eluição (20 mM de imidazol); faixa 5: frações de eluição (30 mM de imidazol); faixa 6: frações de eluição (50 mM de imidazol); faixa 7: frações de eluição (100 mM de imidazol); faixa 8: IgG humana (Sigma), 2 mg/ml; faixa 9: plasma humano 10 mg/ml.

A eletroforese apresentada na Figura 4.21 (íon Cu^{2+}), indicou quantidades relevantes de albumina nas faixas 1 e 2, e a eletroforese apresentada na Figura 4.22 (íon Co^{2+}), indicou quantidades relevantes de albumina na faixa 2 e 4. As duas eletroforeses (Figuras 4.21 e 4.22), apresentaram duas bandas intensas na faixa 3, correspondendo às cadeias pesadas e leves de IgG, além de não apresentar, aparentemente albumina. A eletroforese apresentada na Figura 4.23 (íon Zn^{2+}), indicou a presença de IgG nas faixas 3, 4, 5 e 6, porém contaminadas. Pode-se concluir, através dos resultados com os íons metálicos Cu^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+} e Zn^{2+}, que não foi possível purificar IgG a níveis expressivos.

4.6. Separação de IgG a partir do soro humano utilizando colunas em série com íons metálicos imobilizados

Com intuito de minimizar os contaminantes e melhorar a seletividade na purificação de IgG, optou-se em utilizar duas colunas em série com diferentes íons metálicos imobilizados. Nos ensaios realizados por PORATH et al., 1975, soro humano foi injetado em presença de tampão Fosfato a pH 7,0 em uma primeira coluna contendo o íon metálico Zn^{2+}, e as frações de lavagem da primeira coluna foram injetadas numa segunda coluna contendo o íon metálico Cu^{2+}. Através da eletroforese SDS-PAGE, detectou-se que as proteínas presentes nas frações de lavagem da primeira coluna eram transferrina, α anti-tripsina, ácido glicoproteíco, albumina e IgG, e na segunda coluna era albumina.

A partir destes resultados descrito por PORATH, foi proposto uma estratégia para purificar IgG utilizando duas etapas cromatográficas. Na primeira etapa cromatográfica, utilizou-se uma coluna com Zn^{2+} imobilizado, e equilibrada com tampão Fosfato a pH 7,0, na segunda etapa, testou-se colunas com Ni^{2+}, Cu^{2+} ou Co^{2+} imobilizado. Soro humano foi injetado na primeira coluna. Escolheu-se soro devido ao fato do mesmo apresentar composição de proteínas similar ao plasma, exceto fibrinogênio e fatores de coagulação diminuindo a quantidade de contaminantes da primeira coluna. As frações de lavagem contendo as proteínas descritas por PORATH et al., 1975, foram agrupadas e injetada na segunda coluna. As proteínas adsorvidas na segunda coluna foram dessorvidas por decréscimo de pH ou por incrementos de agente competidor (imidazol).

4.6.1. Influência dos íons metálicos imobilizados e do agente competidor imidazol na separação de IgG a partir do soro humano

Realizou-se a cromatografia usando duas colunas: a primeira com o íon metálico Zn^{2+} imobilizado e equilibrada com tampão Fosfato, e a segunda com o íon metálico Ni^{2+}, Co^{2+} ou Cu^{2+} imobilizado e equilibrada com tampão Mops contendo imidazol. As frações de lavagem da primeira coluna, após a troca de tampão, foram injetadas na segunda coluna contendo o íon metálico Ni^{2+}, Co^{2+} ou Cu^{2+}, conforme o experimento. As proteínas adsorvidas na segunda coluna foram eluídas, a pH 7,0 utilizando-se concentrações crescentes do agente competidor imidazol.

As frações de lavagem e eluição foram quantificadas pelo método Bradford obtendo-se os seguintes resultados apresentados nas Tabelas 13 (a, b), 14 (a, b) e 15 (a, b).

Os resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE), são mostrados nas Figuras 4.24, 4.25 e 4.26, sendo representadas respectivamente com cada ensaio de separação de IgG.

Tabela 13 a: **Ensaios de adsorção e dessorção de proteínas do soro utilizando coluna IDA-Zn^{2+} (1ª coluna).**

Íon Metálico	Soro Injetado		Lavagem Tampão Fosfato pH 7		Eluição Tampão Acetato pH 4	
	mg	%	mg	%	mg	%
Zn^{2+}	49,02	100	46,63	95,1	1,34	2,7

Tabela 13 b: **Ensaios de adsorção e dessorção de proteínas do soro utilizando coluna IDA-Ni^{2+} e tampão Mops contendo imidazol a pH 7 (2ª coluna).**

Sistema tamponante	Injeção		Lavagem (2mM)		Eluição (10mM)		Eluição (20mM)		Eluição (30mM)		Eluição (50mM)		Eluição (100mM)	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Mops contendo imidazol	44,67	100	22,06	49,4	9,32	20,9	7,21	16,1	3,30	7,4	0,88	2,0	0,20	0,5

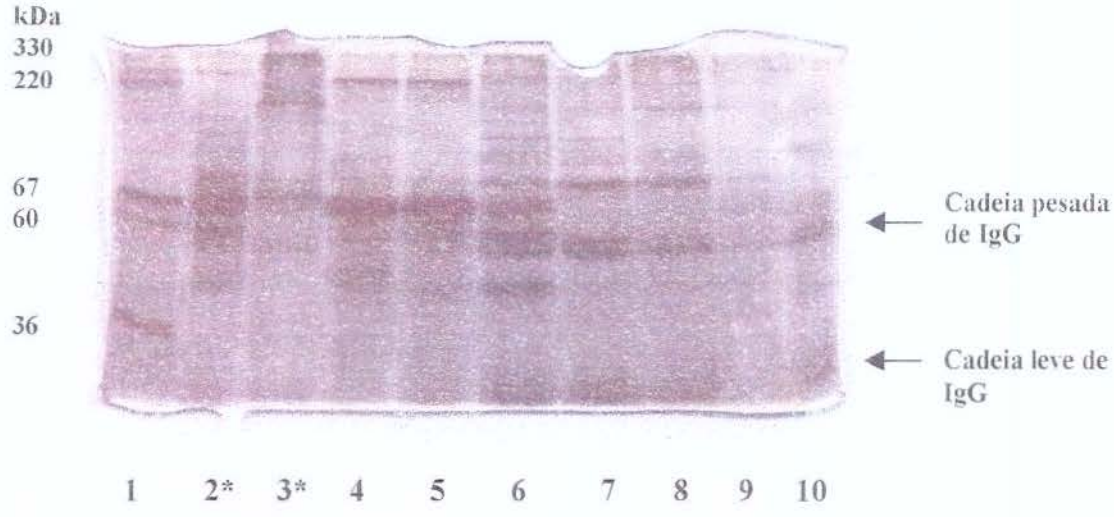

Figura 4.24: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com nitrato de prata. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando os íons metálicos Zn^{2+} (*) e Ni^{2+}, e tampões Fosfato 0,05 M (pH 7), Acetato 0,1 M (pH 4) e Mops contendo 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol, todos com 1M de NaCl. Faixa 1: marcador de alta massa molecular; faixa 2: frações de lavagem (pH 7); faixa 3: frações de eluição (pH 4); faixa 4: frações de lavagem (2 mM de imidazol); faixa 5: frações de eluição (10 mM de imidazol); faixa 6: frações de eluição (20 mM de imidazol); faixa 7: frações de eluição (30 mM de imidazol); faixa 8: frações de eluição (50 mM de imidazol); faixa 9: frações de eluição (100 mM de imidazol); faixa 10: IgG humana (Sigma).

Tabela 14 a: **Ensaios de adsorção e dessorção de proteínas do soro utilizando coluna IDA-Zn^{2+} (1^a coluna).**

Íon Metálico	Soro Injetado		Lavagem Tampão Fosfato pH 7		Eluição Tampão Acetato pH 4	
	mg	%	mg	%	mg	%
Zn^{2+}	49,02	100	45,56	92,9	0,80	1,6

Tabela 14 b: **Ensaios de adsorção e dessorção de proteínas do soro utilizando coluna IDA-Co^{2+} e tampão Mops contendo imidazol a pH 7 (2ª coluna).**

Sistema tamponante	Injeção		Lavagem (2mM)		Eluição (10mM)		Eluição (20mM)		Eluição (30mM)		Eluição (50mM)		Eluição (100mM)	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Mops contendo imidazol	43,66	100	30,18	69,1	10,42	23,9	1,32	3,0	0,22	0,5	0,13	0,3	0,03	0,07

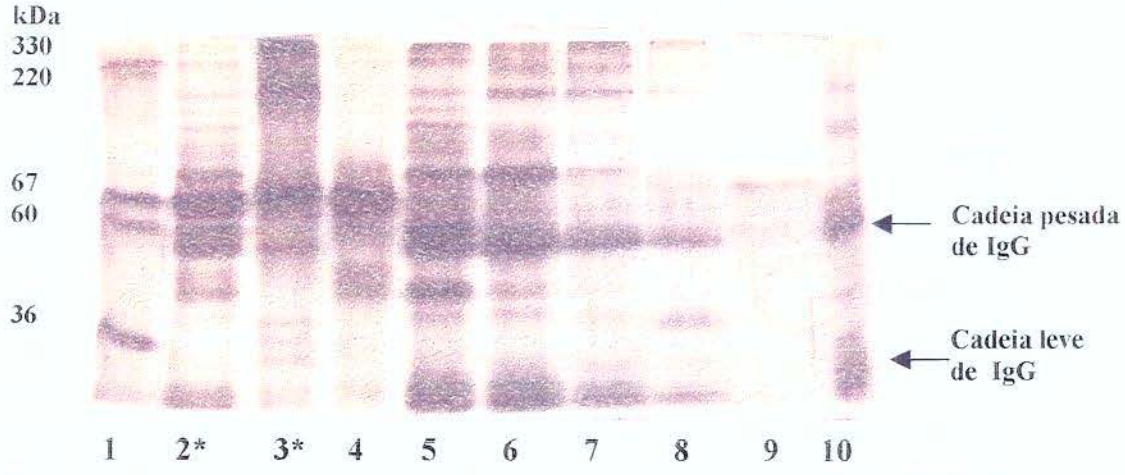

Figura 4.25: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com nitrato de prata. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando os ions metálicos Zn^{2+} (*) e Co^{2+}, e tampões Fosfato 0,05 M (pH 7), Acetato 0,1 M (pH 4) e Mops contendo 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol, todos com 1M de NaCl. Faixa 1: marcador de alta massa molecular; faixa 2: frações de lavagem (pH 7); faixa 3: frações de eluição (pH 4); faixa 4: frações de lavagem (2 mM de imidazol); faixa 5: frações de eluição (10 mM de imidazol); faixa 6: frações de eluição (20 mM de imidazol); faixa 7: frações de eluição (30 mM de imidazol); faixa 8: frações de eluição (50 mM de imidazol); faixa 9: frações de eluição (100 mM de imidazol); faixa 10: IgG humana (Sigma).

Tabela 15 a: **Ensaios de adsorção e dessorção de proteínas do soro utilizando coluna IDA-Zn^{2+} (1ª coluna).**

Íon Metálico	Soro Injetado		Lavagem Tampão Fosfato pH 7		Eluição Tampão Acetato pH 4	
	mg	%	mg	%	mg	%
Zn^{2+}	44,56	100	38,71	86,9	1,14	2,6

Tabela 15 b: **Ensaios de adsorção e dessorção de proteínas do soro utilizando coluna IDA-Cu^{2+} e tampão Mops contendo imidazol a pH 7 (2ª coluna).**

Sistema tamponante	Injeção		Lavagem (2mM)		Eluição (10mM)		Eluição (20mM)		Eluição (30mM)		Eluição (50mM)		Eluição (100mM)	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Mops contendo imidazol	32,26	100	11,39	35,3	9,73	30,2	6,39	19,8	1,68	5,2	0,14	0,43	0,01	0,03

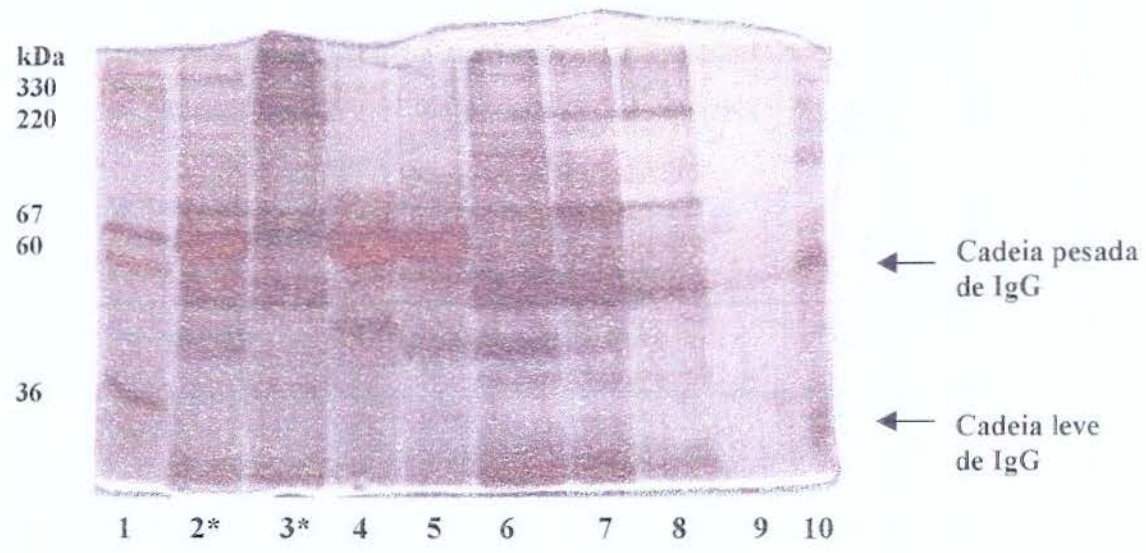

Figura 4.26: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com nitrato de prata. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando os ions metálicos Zn^{2+} (*) e Cu^{2+}, e tampões Fosfato 0,05 M (pH 7), Acetato 0,1 M (pH 4) e Mops contendo 2, 10, 20, 30, 50 e 100 mM de imidazol, todos com 1M de NaCl. Faixa 1: marcador de alta massa molecular; faixa 2: frações de lavagem (pH 7); faixa 3: frações de eluição (pH 4); faixa 4: frações de lavagem (2 mM de imidazol); faixa 5: frações de eluição (10 mM de imidazol); faixa 6: frações de eluição (20 mM de imidazol); faixa 7: frações de eluição (30 mM de imidazol); faixa 8: frações de eluição (50 mM de imidazol); faixa 9: frações de eluição (100 mM de imidazol); faixa 10: IgG humana (Sigma).

Através do sistema de documentação de eletroforese Nucleo Vision (Nucleo Tech, EUA), foi realizado um "scan" dos géis de eletroforese (Laboratório de Imunologia Clínica da Unicamp, sob supervisão do Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner), identificando-se as massas moleculares das proteínas presentes em cada faixa, tendo como referência o marcador de alta massa molecular.

Analisando o gel apresentado na Figura 4.24 (separação utilizando 1ª coluna IDA-Zn^{2+} e 2ª coluna IDA- Ni^{2+}), as cadeias pesadas e leves de IgG foram identificadas nas faixas 4, 5, 6, 7 e 8. Nas faixas 4, 5, 6, observa-se IgG bastante contaminada com albumina e outras proteínas do soro. A eletroforese mostra, nas faixas 7 e 8, IgG eluída da coluna IDA-Ni^{2+} com um principal contaminante de massa molecular de aproximadamente 80 kDa.

Imunoglobulina G foi adsorvida em IDA-Co^{2+}, tendo sido eluída conjuntamente com contaminantes a 10, 20, 30 e 50 mM imidazol, conforme mostra o gel de eletroforese apresentado na Figura 4.25. A eluição realizada com 30 mM imidazol (faixa 7) apresentou, aparentemente, uma melhor separação de IgG, no entanto, esta fração corresponde a somente 0,5% do total de proteínas injetadas na coluna.

Quando utilizou-se como segunda coluna IDA-Cu^{2+}, não obteve-se, de forma semelhante a utilização de IDA-Ni^{2+} e IDA-Co^{2+}, uma purificação de IgG a níveis expressivos. O aumento da concentração de agente competidor de 20 para 30 e 50 mM (faixas 6, 7 e 8) não propiciou a eluição de IgG sem a presença de contaminantes.

Conclui-se, a partir das três eletroforeses SDS-PAGE, que os resultados de separação de IgG a partir do soro utilizando colunas IDA-Zn^{2+}, seguida de IDA-Ni^{2+}, Co^{2+} e Cu^{2+} foram qualitativamente similares.

4.6.2. Influência dos íons metálicos imobilizados e tampão Fosfato e Acetato na separação de IgG a partir do soro humano

Realizou-se cromatografia utilizando duas colunas: a primeira com o íon metálico Zn^{2+} imobilizado e a segunda com o íon metálico Ni^{2+} imobilizado, ambas colunas equilibradas com tampão Fosfato a pH 7,0 contendo 1M de NaCl. O estudo da influência destes tampões (Fosfato e Acetato) na separação de IgG não foram conduzidos com IDA-Co^{2+} e IDA-Cu^{2+} na segunda coluna devido a impossibilidade de realizar gradiente decrescente de pH (desprendimento de metal da coluna), no caso do íon Co^{2+} e a forte retenção de IgG na coluna (eluição com EDTA), no caso do íon Cu^{2+}. As frações de lavagem e eluição obtidas na cromatografia foram quantificadas pelo método Bradford, obtendo-se os seguintes resultados apresentados na Tabela 16 (a, b). Método de análise qualitativa, a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, (SDS-PAGE) é mostrado na Figura 4.27.

Tabela 16 a: **Ensaios de adsorção e dessorção de proteínas do soro utilizando coluna IDA-Zn^{2+} (1^a coluna).**

Íon Metálico	Soro Injetado		Lavagem Tampão Fosfato PH 7		Eluição Tampão Acetato pH 4	
	mg	%	mg	%	mg	%
Zn^{2+}	38,52	100	31,17	80,9	1,37	3,6

Tabela 16 b: **Ensaios de adsorção e dessorção de proteínas do soro utilizando coluna IDA-Ni^{2+} (2^a coluna).**

Sistema tamponante	Injeção		Lavagem pH 7		Eluição pH 6		Eluição pH 5		Eluição pH 4	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Fosfato e Acetato	26,52	100	14,12	53,2	6,80	25,6	1,99	7,5	0,18	0,7

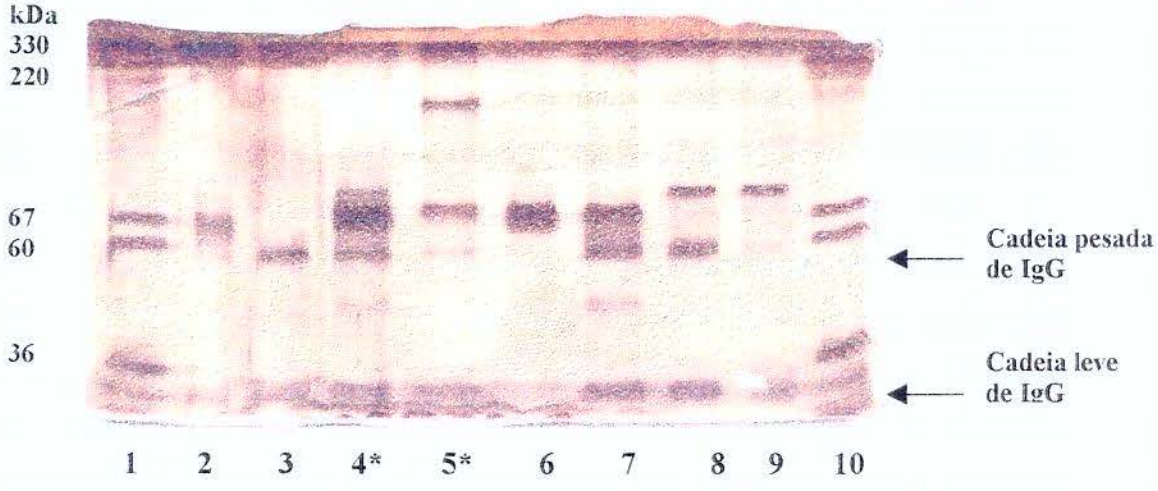

Figura 4.27: Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Revelação com nitrato de prata. Amostras em condições desnaturantes e redutoras, obtidas a partir das cromatografias utilizando os íons metálicos Zn^{2+} (*) e Ni^{2+}, e tampões Fosfato 0,05 M (pH 7 e 6) e Acetato 0,1 M (pH 5 e 4) ambos contêm 1M de NaCl. Faixa 1: marcador de alta massa molecular; faixa 2: amostra do soro humano utilizado; faixa 3: IgG humana (Sigma); faixa 4: frações de lavagem (pH 7); faixa 5: frações de eluição (pH 4); faixa 6: frações de lavagem (pH 7); faixa 7: frações de eluição (pH 6); faixa 8: frações de eluição (pH 5); faixa 9: frações de eluição (pH 4); faixa 10: marcador de alta massa molecular.

Através do sistema de documentação de eletroforese Nucleo Vision (Nucleo Tech, EUA), foi realizado um "scan" dos géis de eletroforese (Laboratório de Imunologia Clínica da Unicamp, sob supervisão do Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner), identificando-se as massas moleculares das proteínas presentes em cada faixa, tendo como referência o marcador de alta massa molecular.

Analisando o gel apresentado na Figura 4.27 (separação utilizando 1ª coluna IDA-Zn^{2+} e 2ª coluna IDA- Ni^{2+}), as cadeias pesadas e leves de IgG foram identificadas nas faixas 4, 5, 7 e 8. A faixa 8 apresenta a melhor purificação de IgG, contaminada com proteína de aproximadamente 80 kDa. Esta faixa contém proteínas eluídas a pH 5,0, correspondendo a 7,5 % do total injetado. Deve-se ressaltar que a purificação de IgG usando duas colunas cromatográficas, foi mais satisfatória que os ensaios anteriores que se utilizaram somente uma coluna.

Com as frações de eluição apresentadas na faixa 8 da eletroforese, que corresponde as frações eluídas a pH 5,0, realizou-se uma imunodifusão radial em duplicata, verificando qualitativamente a presença das classes de imunoglobulina (IgG, IgA e IgM).

Após a coloração da lâmina (Figura 4.28), pôde-se ver um simples arco, confirmando a reação entre o antígeno e seu anticorpo IgG. Esta análise por imunodifusão radial complementou o análise realizado com eletroforese SDS-PAGE, pois através da revelação, detectou somente a presença de IgG dentre as outras imunoglobulinas.

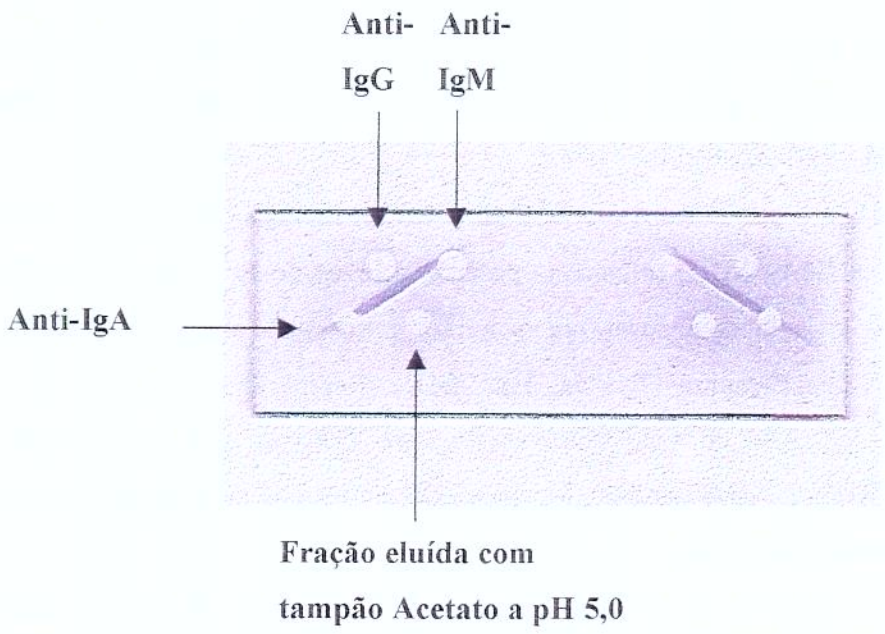

Figura 4.28: Lâmina (gel de agarose 1%), contendo no orifício inferior a fração eluída com tampão Acetato a pH 5, e nos orifícios superiores e laterais (esquerda e direita) os respectivos anti-soros humano: IgG, IgM e IgA.

Após a realização da imunodifusão radial, fez-se a dosagem dos níveis de IgG, IgM, IgA e transferrina, através de nefelometria. Os resultados das frações de eluição a pH 5,0 foram 41,90% de IgG, 1,34% de IgM, 2,10% de IgA e 54,69% de transferrina. As proteínas contaminantes, transferrina e IgM, podem ser removidas da amostra por cromatografia de filtração em gel. Esta técnica empregada na fase final do processo de purificação, separa proteínas de acordo com o tamanho, sendo estas proteínas de tamanhos bem distintos (IgG, 150 kDa, transferrina, 80 kDa e IgM, 900 kDa), resultará IgG com alto grau de pureza.

4.7. Distribuição de ponto isoelétrico nas frações retidas e não retidas de IgG

Constatou-se no decorrer deste trabalho que IgG, a partir do plasma/soro humano ou purificada (Sigma), apresentou retenções diferenciadas nas matrizes IMAC estudadas, conforme o sistema tamponante utilizado. Estas diferentes afinidades pelos íons metálicos imobilizados foram observadas devido ao fato da IgG humana ser policlonal, apresentando quatro subclasses e vários pontos isoelétrico (variando de 5 a 9). Baseando-se nos resultados obtidos dos experimentos realizados com IgG humana (Sigma), selecionou-se os íons Ni^{2+} e Zn^{2+}, e os sistemas tamponantes Fosfato-Acetato e Mops-imidazol, para a análise da distribuição de pontos isoelétricos (pI) nas frações retidas e não retidas de IgG. Cromatografias com IgG humana (Sigma) similares àquelas descritas no item 4.2 foram realizadas com estes íons metálicos e sistemas tamponantes. As frações eluidas foram analisadas por eletroforese IEF. Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 4.29, 4.30 e 4.31.

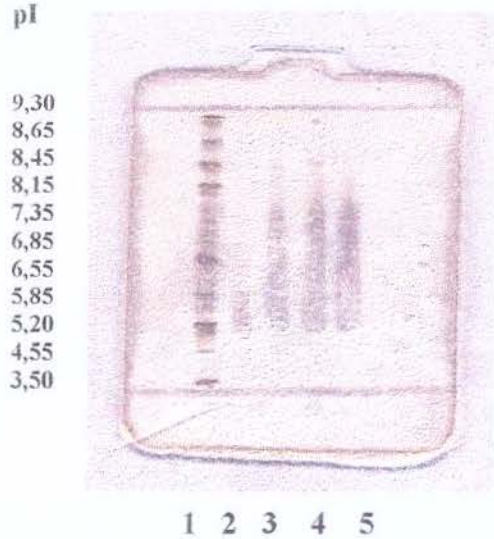

Figura 4.29: Gel de eletroforese IEF, gradiente 3 a 9 (Phast gel). Revelação com nitrato de prata. Amostras obtidas a partir da cromatografia utilizando o íon metálico Ni^{2+}, e tampões Fosfato 0,05 M (pH 7 e 6) e Acetato 0,1 M (pH 5) ambos contendo 1M de NaCl. Faixa 1: marcador de ponto isoelétrico 3-10; faixa 2: frações de lavagem (pH 7), 0,16 mg/ml; faixa 3: frações de eluição (pH 6), 0,16 mg/ml; faixa 4: frações de eluição (pH 5), 0,16 mg/ml; faixa 5: 2 mg/ml de IgG humana (Sigma).

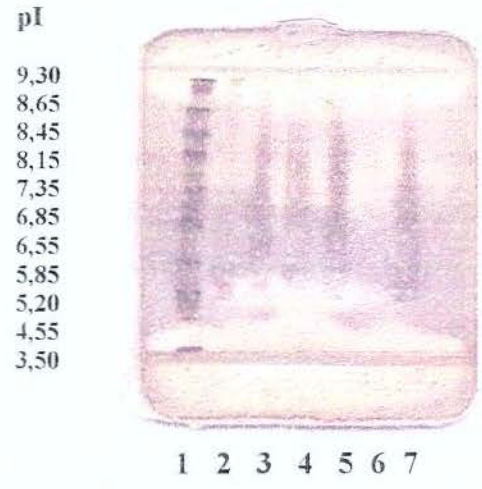

Figura 4.30: Gel de eletroforese IEF, gradiente 3 a 9 (Phast gel). Revelação com nitrato de prata. Amostras obtidas a partir da cromatografia utilizando os íons metálicos Ni^{2+}, e tampões Mops contendo 2, 10, 20, 30 e 50 mM de imidazol com 1M de NaCl. Faixa 1: marcador de ponto isoelétrico 3-10; faixa 2: pico de lavagem (2 mM de imidazol), 0,2 mg/ml; faixa 3: pico de eluição (10 mM de imidazol), 0,25 mg/ml; faixa 4: pico de eluição (20 mM de imidazol), 0,25 mg/ml; faixa 5: pico de eluição (30 mM de imidazol), 0,25 mg/ml; faixa 6: pico de eluição (50 mM de imidazol), 0,07 mg/ml; faixa 7: 2 mg/ml de IgG humana (Sigma).

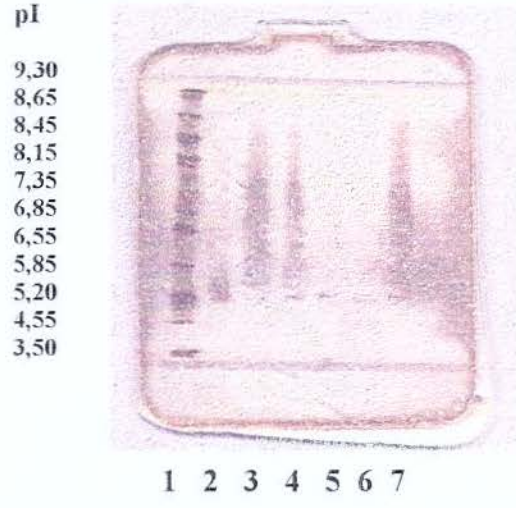

Figura 4.31: Gel de eletroforese IEF, gradiente 3 a 9 (Phast gel). Revelação com nitrato de prata. Amostras obtidas a partir da cromatografia utilizando os íons metálicos Zn^{2+}, e tampões Mops contendo 2, 10, 20, 30 e 50 mM de imidazol com 1M de NaCl. Faixa 1: marcador de ponto isoelétrico 3-10; faixa 2: pico de lavagem (2 mM de imidazol), 0,09 mg/ml; faixa 3: pico de eluição (10 mM de imidazol), 0,20 mg/ml; faixa 4: pico de eluição (20 mM de imidazol), 0,20 mg/ml; faixa 5: pico de eluição (30 mM de imidazol), 0,03 mg/ml; faixa 6: pico de eluição (50 mM de imidazol), 0,01 mg/ml; faixa 7: 2 mg/ml de IgG humana (Sigma).

A análise das frações de lavagem e de eluição, através de focalização isoelétrica, mostra que a distribuição de pontos isoelétricos nas frações de lavagem e eluição não dependeu do íon metálico imobilizado (dentre os estudados), nem do sistema tamponante utilizado. Observa-se que as frações não retidas (lavagem) contém IgG de baixo pI (entre 5,0 e 6,0). Não obteve-se seletividade na eluição de IgG por decréscimo de pH (íons Ni^{2+} imobilizado) ou incrementos na concentração de imidazol (íons Ni^{2+} e Zn^{2+} imobilizados); todas as frações apresentaram pI de 6,0 a 8,65, não havendo a separação.

Constatou-se, através deste estudo, que as colunas IDA-Zn^{2+} e IDA- Ni^{2+} podem ser utilizadas para separar IgG de pontos isoelétricos mais baixos, podendo contribuir em estudos de caracterização de anticorpos ou auto-anticorpos.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

5.1. CONCLUSÃO

Os íons metálicos Cu^{+2}, Ni^{+2}, Zn^{+2} e Co^{+2} imobilizados em IDA-Sepharose foram avaliados neste trabalho como ligantes pseudobioespecíficos para a purificação de imunoglobulina G de amostras séricas humana. O estudo dos efeitos do sistema tamponante e de agente competidor sobre as etapas de adsorção e dessorção permitiu identificar as condições que propiciaram a adsorção mais favorável de IgG e, ao mesmo tempo, uma dessorção significativa da proteína com decrécimo de pH ou incremento do agente competidor, sem necessidade de realização de uma dessorção com EDTA.

Os resultados deste estudo mostraram que a força de retenção de IgG nas matrizes IMAC estudadas seguiu a ordem decrescente de retenção: $Co^{+2} > Cu^{+2} > Ni^{+2} > Zn^{+2}$, quando o sistema tamponante Mops-Imidazol foi utilizado, mostrando diferentes afinidades de IgG pelas matrizes estudadas. Estes resultados divergem daqueles obtidos com proteínas modelos em sistema tamponante Fosfato a 20 mM apresentados por SULKOWSKI, 1989, onde a força de retenção da proteína seguiu a ordem decrescente: $Cu^{+2} > Ni^{+2} > Zn^{+2} \geq Co^{+2}$.

A matriz IDA-Ni^{2+} foi escolhida para a realização dos primeiros ensaios de purificação de IgG a partir do plasma, uma vez que a quantidade de IgG (Sigma) adsorvida

no suporte e eluída em cada pH ou incremento do agente competidor foi significativa em relação aos outros íons metálicos estudados.

Testes com plasma humano foram realizados para verificar a seletividade da matriz gel IDA-Ni^{2+} em adsorver IgG em diferentes sistemas tamponantes. Os resultados da eletroforese SDS-PAGE mostraram que não foi possível purificar IgG a níveis expressivos, devido a presença de contaminantes como albumina e outras proteínas do plasma. Assim, propôs-se purificar IgG a partir do plasma humano utilizando outros íons metálicos Cu^{2+}, Co^{2+} e Zn^{2+}. Resultados mostraram que também não foi possível purificar IgG a níveis expressivos.

Uma outra estratégia para purificar IgG em duas etapas cromatográficas foi testada. Na primeira etapa cromatográfica utilizou-se coluna com Zn^{2+} imobilizado e na segunda etapa usou-se coluna com Ni^{2+}, Cu^{2+} ou Co^{2+} imobilizado. Finalmente IgG foi obtida, sem contaminação de albumina, após cromatografias em IDA-Zn^{2+} seguida em IDA-Ni^{2+}, porém através da dosagem por nefelometria, pode-se constatar na fração eluída baixa porcentagem de IgG (41,90%) e alta contaminação de transferrina (54,69%).

Em continuidade às atividades, foi realizado eletroforese IEF, a fim de verificar se houve a separação de pontos isoelétricos de IgG. IgG humana utilizada neste trabalho é policlonal, o que explica as diferentes porcentagens de IgG obtidas em cada pico de eluição. Verificou-se através desta técnica, que as frações não retidas (lavagem) contém IgG de baixo pI (5 a 6), e as frações de eluição contém IgG de mais alto pI.

5.2. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

A fim de melhorar os resultados da purificação de IgG, propõe-se:

i – Remover o contaminante transferrina por cromatografia de filtração em gel. Esta técnica empregada na fase final do processo de purificação, separa IgG da transferrina, pois estas proteínas apresentam tamanhos bem distintos (IgG, 150 kDa e transferrina, 80 kDa). O grau de pureza de IgG poderá ser superior ao obtido comercialmente (95%);

ii – Utilização de outros agentes quelantes, tais como TED e TREN, que interagem mais fracamente com proteínas;

iii – Utilização de outra matriz, que possibilite uma maior densidade de ligantes e aplicação a altas vazões;

iv – Obtenção de parâmetros (cinética de adsorção de IgG) de projetos em colunas de separação utilizando o método proposto na tese, visando a ampliação de escala.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSSON, L. e PORATH, J. Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe^{3+}) affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, 154, p. 250-254, 1986.

ANDERSSON, L., SULKOWSKI, E. e PORATH, J. Immobilized metal ion affinity chromatography of serum albumin. *Cancer Research*, 47, p. 3624-3626, 1987.

BAUN, S. J. Introduction to organic and biological chemistry. Editora Collier Macmillan Publishers, Londres. Cap. 20: The blood, p. 497-500, 1978.

BEITLE, R. R. e ATAAI, M. M. One-step purification of model periplasmic protein from inclusion bodies by its fusion to effective metal-binding peptide. *Biotechnology Progress*, 9, p. 64-69, 1993.

BELLANTI, J. A. Imunologia: Noções Básicas. Editora Igaku Shain: W.B. Saunders, Japão. Cap.5: Anticorpos e Imunoglobulina, p. 107-127, 1985.

BELEW, M. e PORATH, J. Immobilized metal-ion affinity-chromatography-effect of solute structure, ligand density and salt concentration on the retention of peptides. *Journal of Chromatography, 516,* p. 333-354, 1990.

BERNARD, J., LEVY, J.-P., VARET, B., CLAUVEL, J.-P., RAIN, J.D e SULTAN, Y. Hématologie, Masson, Paris, p. 193-267, 1990.

BIANCHI, F. R., SAUTIÈRE, R-P., e ROUSSEAUX, J. Fracionation of basic nuclear proteins of human sperm by zinc chelate chromatography. *Journal of Chromatography,* 518, p. 123-134, 1990.

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

BLAKESLEY, R. W. e BOEZI, J. A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry,* 82, p. 580-582, 1977.

BODEN, V., WINZERLING, J. J., VIJAYALAKSHMI, M.A. e PORATH, J. Rapid one-step purification of goat immunoglobulins by immobilized metal ion affinity chromatography. *Journal of Immunological Methods,* 181, p. 225-232, 1995.

BOYLE, M. D. P.. FAULMANN, E. L. e METZGER, D. W. Applications of bacterial immunoglobulin-binding proteins to the purification of immunoglobulins. *Molecular Interactions in Bioseparations,* 6, p. 91-112, 1993.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, p. 248-254, 1976.

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

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

CALICH, V. L.G e VAZ, C. A. C. Imunologia Básica. Editora Artes Médica, Porto Alegre. Cap. 5: Imunoglobulinas, p. 65-103, 1989.

CASSULIS, P. e MAGASIC, M. V. DEBARI, V. A. Ligand affinity chromatography separation of serum IgG on recombinant protein G-Silica. *Clinical Chemistry* 37, 6, p. 882-886, 1991.

CHAGA, G. S.; ERSSON, B. e PORATH, J. Isolation of calcium-binding proteins on selective adsorbents. Application to purification of bovine calmodulin. *Journal of Chromatography A*, 732, p. 261-269, 1996.

CHARCOSSET, C., SU, Z., KAROOR, S., DAUN, G. e COLTON, C.K. Protein A immunoaffinity Hollow fiber membranes for immunoglobulin G purification: experimental characterization. *Biotechnology and Bioengineering*, 48, p. 415-427, 1995.

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

CHICZ, R. M. e REGNIER, F. E. Single amino-acid contributions to protein retention cation-exchange chromatography- resolution of genetically engineered subtilisin variants. *Analytical Chemical*, 18, p. 2059-2066, 1989.

COCHET, S., HASNAOUI, M., MARTINE, D., KROVIARSKI, Y., LAMBIN, P., CARTRON, J. P. e BERTRAND, O. Chromatography of human immunoglobulin G on immobilized Drimarene Rubine R/K-5BL study of mild, efficient elution procedures. *Journal of Chromatography A*, 663, p. 175-186, 1994.

COHN, E.J., STRONG, L. E., HUGHES JR., W. L., MULFORD, D. J., ASHWORTH, J. N., MELIN, M e TAYLOR, H.L. *Journal of American Chemical Society*, 68, p. 459-475, 1946.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., e BONATO, P. S. Introdução a métodos cromatográficos. Editora da UNICAMP, Campinas, 1995.

DUHAMEL, R.C.; SCHUR, P. H., BRENDAL, K. e MEEZAN, E. pH gradient elution of human IgG_1, IgG_2, IgG_4 from protein-A Sepharose. *Journal of Immunological Methods*, 31, p. 311-217, 1979.

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, p. 47-53, 1992.

FOSTER, P. R., DICKSON, A. J., STENHOUSE, A. e WALKER, E. P. A process control system for the fractional precipitation of human plasma proteins. *Journal of Chemical Technological/ Biotechnological*, 36, 10, p. 461-466, 1986.

FÜGLISTALLER, P. Comparison of immunoglobulin binding capacities and ligand leakage using eight different protein A affinity chromatography matrices. *Journal of Immunological Methods*, 124, p. 171-176, 1989.

GOHEEN, S. C. e MATSON, R . S. Purification of human serum gamma globulins by hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 326, p. 235-241, 1985.

HALE, J. e BEIDLER, D. E. Purification of humanized murine and murine monoclonal antibodies using immobilized metal-affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, 222, p. 29-33, 1994.

HARRIS, E. L. V. e ANGAL, S. Protein purification methods. A practical approach. Editora oxford university press, Nova York. Cap. 4: Separation based on structure, p. 175-242, 1989.

HASNAOUI, M. H., DEBBIA, M., COCHET, S., CARTRON, J. P., LAMBIN, P. e BERTRAND, O. Screening of a large number of dyes for the separation of human immunoglobulin G_2 from the other immunoglobulin G subclasses immunoglobulin G_2 enrichment on immobilized procion yellow HE-4R. Journal of *Chromatography A*, 766, p. 49-60, 1997.

HEMDAN, E. S. e PORATH, J. Development of immobilized metal affinity chromatography. *Journal of chromatography*, 323, p. 255-264, 1985.

HEUKESHOVEN, J. e DEUNICK, R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6, p. 103-112, 1985.

HUTCHENS, T.W. e PORATH, J. Thiophilic adsorption of immunoglobulins-analysis of conditions optimal for selective immobilization and purification. *Analytical Biochemistry*, 159, p. 217-226, 1986

JAMES, K. e STANWORTH, D. R. Studies on the chromatography of human serum proteins on diethylaminoethyl (DEAE)- cellulose. The effect of the chemical and physical nature of the exchanger. *Journal of Chromatography*, 15, p. 324-335, 1964.

JANSON, J. Protein purification: principles, high-resolution methods, and applications. Editora J. Wiley, Nova York. Cap. 8: Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography, p. 227-251, 1998.

KOKI, T., INUI, T., OKABE, H., OCHI, Y. e KAJITA, Y. Separation methods of fragments using protein L. *Immunological investigations*, 26, p. 399-408, 1997.

KRISHNAN, S. e VIJAYALAKSHMI, M.A. Purification of an acid protease and a serine carboxypeptidase from *Aspergillus Niger* using metal-chelate affinity chromatography *Journal of Chromatography*, 397, p. 339-346, 1987.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T 4. *Nature*, 227, p. 680-685, 1970.

LEE, W. e CHUANG, C. Performance of pH elution in high-performance affinity chromatography of proteins using non-porous silica. *Journal of Chromatography A*, 721, p. 31-39, 1996.

LEHNINGER, A. Princípios da Bioquímica. Cap. 14: Anticorpos e receptores da células T, p.341-363. Editora Blucher, São Paulo, 1986.

LEIBL, H., ERBER, W., EIBL, M. M., e MANNHALTER, J. W. Separation of polysaccharide-specific human immunoglobulin G subclasses using a protein A superose column with a pH gradient elution system. *Journal of Chromatography*, 639, p. 51-56, 1993.

LONNERDAL, B. L., CARLSSON, J. e PORATH, J. Isolation of lactoferrin from human milk by metal-chelate affinity chromatography. *FEBS Letters*, 75, p. 89-92, 1977.

MANDARO, R.M., ROY, S. e HOU, K. C. Filtration supports for affinity separation. *Bio/Technology*, 5, p. 928-932, 1987.

MANTOVAARA, T., PERTOFT, H. e PORATH, J. Carboxymethylated aspartic-acid agarose, a selective adsorbent for calcium-binding proteins, preliminary studies. *Biotechnological Application Biochemical*, 13, p.315-322, 1991.

MAYER, R. J. e WALKER, J. H. Immunochemical methods in cell and molecular biology. Editora Academic press, Londrês. Cap. 7: Technical Supplement, p. 193-284, 1990.

MÜLLER-SCHULTE, D., MANJINI, S. e VIJAYALAKSHMI, M. A. Comparative affinity chromatographic studies using novel grafted polyamide and poly (vinyl alcohol) media. *Journal of Chromatography*, 539, p. 307-314, 1991.

MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A. e RODWEL, V. W. Bioquímica. Editora Atheneu, São Paulo. Cap 55: Plasma sangüíneo e coagulação, p. 617-623, 1990.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for protein in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*, 117, p. 307-310, 1981.

NILSON, B. H. K., LÖGDBERG, L., KASTERN, W., BJÖRCK, L. e AKERSTRÖM, B. Purification of antibodies using protein L-binding framework structures in the light chain variable domain. *Journal of Immunological Methods*, 164, p. 33-40, 1993.

ÖSTLUND, C. Large-scale purification of monoclonal antibodies. *Trends in Biotechnology*, p. 288-293, 1986.

PEROSA, F., CARBONE, R., FERRONE, S. e DAMMACCO, F. Purification of human immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and ammonium sulphate. *Journal of Immunological Methods*, 128, p. 9-16, 1990.

PHILLIPS, A. P., MARTIN, K.L. e HORTON, W.H. The choice of methods for immunoglobulin IgG purification: yield and purity of antibody activity *Journal of Immunological Methods*, 74, p. 385-393, 1984.

PORATH, J., CARLSSON, J., OLSSON, I. e BELFRAGE G. Metal Chelate Affinity Chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258, p. 598-599, 1975.

PORATH, J. e OLIN, B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel- immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry*, 22, p. 1621-1630, 1983.

PORATH, J. Metal-ion hydrophobic, thiophilic and II-electron governed interactions and their application to salt-promoted protein adsorption chromatography. *Biotechnology Progress*, 3, p. 14-21 , 1987.

PORATH, J. IMAC-Immobilized metal ion affinity based chromatography. *Tends in analytical chemistry*, 7, p. 254-259, 1988.

STITES, D. P. e TERR, A. I. Imunologia Básica. Editora Prentica Hall, Rio de Janeiro. Cap. 9: Função e estrutura das imunoglobulinas, p. 89-94, 1992.

SCULLY, M. F. e KAKKAR, V. V. Structural features of fibrinogen associated with biding to chelate zinc. *Biochemical et Biophysical Acta*, 700, p. 130-133, 1982.

SULKOWSKI, E. Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*, 3, p. 1-11, 1985.

SULKOWSKI, E. Immobilized metal-ion affinity chromatography of proteins on IDA-Fe^{3+}. *Makromol Chem-M SYMP*, 17, p. 334-335, 1988.

SULKOWSKI, E. The saga of IMAC and MIT *Bio Essays*, 10, p. 170-175, 1989.

VANDER, A. J. Fisiologia humana: os mecanismos da função de órgãos e sistemas. Editora Mc Graw-Hill, São Paulo, 1981.

VÁZQUEZ-MORENO, L. e PLATA, M. D. C. C. Scale up isolation of immunoglobulins from pig serum by immobilized metal affinity chromatography. *Journal of Food Biochemistry*, 19, p. 367-380, 1996.

VIJAYALAKSHMI, M A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. *Trends in Biotechnology*, 7, p. 71-76, 1989.

VLUG, A. e VAN REMOTEL, P. The structure and function of human IgG subclasses. *American Clinical Laboratory*, 8, p. 26-36, 1989.

WINZERLING, J. J., BERNA, P. e PORATH, J. How to use immobilized metal ion affinity chromatography. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 4, p. 4-13, 1992.

WONG, J., ALBRIGTH, R. L. e WANG, N. H. W. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC)-chemistry and bioseparation applications. *Separation and purification methods*, 20, 1, 49-106, 1991.

YIP, T. e HUTCHENS, T. W. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Molecular Biotechnology*, 1, p. 151-164, 1994.