UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

ADSORÇÃO DE IgG HUMANA EM DUAS MATRIZES POROSAS DERIVATIZADAS COM O LIGANTE HISTIDINA

Autora
Engª Luciana Cristina Lins de Aquino

Orientadora
Profª. Drª. Sônia Maria Alves Bueno

Co-orientador
Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Tese 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.

2001110

Campinas – São Paulo
Agosto, 2000

UNICAMP

UNIDADE BC
Nº CHAMADA:
T/UNICAMP
Aq56a
V. Ex.
TOMBO BC/ 43006
PROC. 16-278/00
C [ ] D [X]
PREÇO R$ 11,00
DATA 07/11/00
Nº CPD

CM-00149565-6

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

Aq56a

Aquino, Luciana Cristina Lins de
Adsorção de IgG humana em duas matrizes porosas derivatizadas com o ligante histidina / Luciana Cristina Lins de Aquino.--Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientadores: Sônia Maria Alves Bueno, Paulo de Tarso Vieira e Rosa.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Adsorção. 2. Imunoglobulina G. 3. Doenças auto-imunes. 4. Sangue – Circulação artificial. I. Bueno, Sônia Maria Alves. II. Vieira e Rosa, Paulo de Tarso. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

Área de Concentração:

Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO:

Adsorção de IgG humana em duas matrizes porosas derivatizadas com o ligante histidina, defendida por Luciana Cristina Lins de Aquino e aprovada em 29 de Agosto de 2000 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Orientadora
Profª Drª Sônia Maria Alves Bueno
Co-orientador
Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa

Sônia Bueno

Profª.Drª. Sônia Maria Alves Bueno

Universidade Estadual de Campinas – FEQ

Prof. Dr. Carlos Roque Duarte Correia

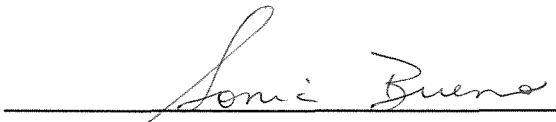
Universidade Estadual de Campinas – IQ

Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Universidade Estadual de Campinas – FEQ

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida pela Engª Química Luciana Cristina Lins de Aquino e aprovada pela comissão julgadora em 29 de Agosto de 2000.



Orientadora: Profª .Drª. Sônia Maria Alves Bueno

Às pessoas mais importantes e maravilhosas deste mundo

Meus pais Luís Soares de Aquino e Maria Tama Lins de Aquino

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pela força e perseverança que me fez vencer o pior inimigo, a saudade.

Um agradecimento especial à minha super mãe, Maria Tama, ao meu super pai, Luís Soares, ao meu irmão André e a minha tia Rita Glaura, pelas orações e apoio emocional durante todo o meu trabalho.

À Profª.Drª.Sônia Maria Alves Bueno e Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa pela brilhante orientação durante o desempenho deste trabalho.

Ao Prof. Dr. César Costapinto Santana pela realização dos experimentos em seu laboratório

À Profª.Drª Maria Helena Andrade Santana e o Prof. Dr. Everson Alves Miranda pelas valiosas sugestões no exame de qualificação

Ao Prof. Dr. Carlos Roque Duarte Correia pelo material concedido para a realização de alguns experimentos.

Às amigas Líbia Conrado, Cristiane e Adriana pelo apoio e serenidade nos momentos mais difícies.

Aos amigos maceioenses: Elaine, Wanda, Sérgio, Wagner, Ronaldo, Felipe, ao meu primo Édler pelo apoio familiar.

Aos amigos Márcio, Andréa e Ângela pela apoio e paciência.

Aos amigos do laboratório: Elcimar, Vinícius, Fábio, José Antônio, Eduardo, Ana Carolina pelas sugestões e companherismo no laboratório.

Ao apoio financeiro da FAPESP, FAEP e PADCT, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

RESUMO

A técnica de adsorção por afinidade, que utiliza adsorventes com alta seletividade para adsorver compostos, principalmente proteínas, tem sido empregada para remover auto-anticorpos do plasma de pacientes com doenças auto-imunes e também na produção em larga escala de drogas terapêuticas através do fracionamento do plasma humano ou animal. Na circulação extracorpórea o plasma do paciente é alimentado em uma coluna contendo um ligante imobilizado em uma matriz insolúvel que remove os auto-anticorpos, e as proteínas não adsorvidas retornam para o paciente sem nenhuma alteração. Na busca de sistemas adequados para a aplicação no tratamento de doenças auto-imunes, esta pesquisa investiga a adsorção de IgG em dois suportes de afinidade empregando a histidina como ligante, imobilizado em membranas de fibras ocas de álcool poli etileno vinílico (PEVA) e gel de copolímero de metacrilato (Toyopearl), denominados His-PEVA e His-Toyopearl, respectivamente. Sendo verificada a possibilidade de adsorção de IgG em ambos suportes, experimentos de seletividade e de capacidade de adsorção em modo dinâmico e estático demonstraram uma maior eficiência para o sistema His-PEVA do que para o His-Toyopearl, tanto na presença do tampão Hepes a pH 7,0 como do Tris-HCl pH a 7,4. Através da obtenção de isotermas de adsorção, para os suportes com e sem ligante, à temperatura ambiente e à 37 °C, foi constatada a existência de interações não-específicas entre a proteína e a matriz, sendo necessário efetuar as etapas de lavagem, eluição e regeneração, após ser atingido o equilíbrio de adsorção, para obter a quantidade de proteína adsorvida especificamente nos suportes. A determinação de parâmetros como a capacidade máxima de adsorção, a constante de dissociação do complexo IgG-histidina (K_d) e as constantes cinéticas de adsorção (k_a) de dessorção (k_d) de proteína, indicaram que apesar de ambos sistemas apresentarem uma afinidade pela proteína da mesma ordem de grandeza (10^{-5}M), o suporte His-PEVA apresenta uma maior capacidade para a adsorção específica de proteína, nas temperaturas analisadas.

Palavras chave: histidina, tratamento extracorpóreo, IgG, doenças auto-imunes, adsorção.

ABSTRACT

Affinity adsorption explores the characteristics that certain compounds have to selectively interact with substances or classes of substances. This technique has been used to purify proteins in small and large scale and also to remove autoantibodies from plasma of autoimmune patients. In an extracorporeal treatment, the autoantibodies are retained in a column that contains an affinity ligand immobilized in an insoluble matrix. The unretained fraction containing the plasma proteins different from the autoantibodies can be returned to the patient. In this work, the behavior of IgG adsorption either onto poly ethylene vinyl alcohol (PEVA) hollow-fiber membranes or onto metacrylate gels (Toyopearl) containing histidine as affinity ligand was studied. The IgG adsorption in both supports was feasable. The selectivity studies as well as the static and dynamic adsorption experiments showed that the IgG adsorption onto PEVA hollow-fibers was more efficient than onto Toyopearl, independently if Hepes pH 7.0 or Tris-HCl 7.4 buffer were used. The adsorption isotherms of IgG in the supports with or without ligand showed that there is also non-specific adsorption of the protein onto the matrix surface. The amount of specifically adsorbed protein was determined by the elution and regeneration of the support following extensive washing of the particles with buffer. The values of the adsorption capacity constant (Q_m), dissociation constant of the IgG-histidine complex (K_d), adsorption constant (k_a), and desorption constant (k_d) indicated that both systems have approximately the same affinity for the IgG (10^{-5} M) and that PEVA hollow-fibers have a large specific adsorption capacity. This behavior was observed for temperatures of 25 and 37 °C.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Introdução

1.1 - Relevância da terapêutica das doenças auto-imunes 1

1.2 – Objetivo e etapas da pesquisa 3

CAPÍTULO 2 – Revisão Bibliográfica

2.1 – Doenças auto-imunes 5

2.2 – Auto-anticorpos 6

2.2.1 – Definição e estrutura 6

2.3 – Tratamento das doenças auto-imunes 8

2.4 – Adsorção em sistemas de afinidade 15

2.4.1- Princípios de Adsorção 16

2.4.2 – Adsorção em géis de afinidade 20

2.4.3 – Adsorção em membranas de afinidade 24

CAPÍTULO 3 – Materiais e Métodos

3.1 – Materiais 29

3.2 – Métodos 31

3.2.1 - Ativação das matrizes com 1,4 butanodiol diglicidil éter 31

3.2.2 – Imobilização de L-histidina nas matrizes ativadas 32

3.2.3 – Determinação da densidade de ligantes imobilizados nos suportes His-PEVA e His-Toyopearl 33

3.2.4 – Determinação de proteína total 34

3.2.5 – Eletroforese SDS-PAGE das proteínas adsorvidas e não adsorvidas nos suportes derivatizados e não derivatizados 34

3.2.6 – Cromatografia em colunas com gel His-Toyopearl ou membranas His-PEVA finamente cortadas 34

3.2.7 – Experimentos para a determinação da seletividade 36

3.2.8 – Determinação da capacidade de adsorção
em modo frontal para os sistemas His-PEVA e His-Toyopearl 37
3.2.9 – Análise de equilíbrio de adsorção em tanques agitados 38
3.2.10 – Análise de equilíbrio de adsorção considerando
as etapas de eluição e regeneração dos suportes 39
3.2.11 – Cinética de adsorção dos suportes His-PEVA
e His-Toyopearl 40

CAPÍTULO 4 – Resultados e discussões
4.1 – Ativação dos suportes e imobilização de histidina 41
4.2 – Adsorção de IgG nos suportes de afinidade
utilizando Hepes como tampão de adsorção 42
4.2.1 – Ensaios preliminares 42
4.2.2 – Determinação da capacidade de adsorção
dos suportes em modo frontal 45
4.2.3 – Seletividade dos suportes de afinidade
em presença de tampão Hepes 47
4.2.4 – Análise de equilíbrio de adsorção em tanques agitados 49
4.3 – Adsorção de IgG nos suportes de afinidade
utilizando Tris-HCl como tampão de adsorção 52
4.3.1 – Seletividade dos suportes de afinidade
em presença de tampão Tris-HCl 52
4.3.2 – Determinação da capacidade de adsorção
dos suportes em modo frontal 54
4.3.3 – Isotermas de adsorção de IgG 57
Isotermas de adsorção de IgG à temperatura ambiente 58
Isotermas de adsorção de IgG à temperatura de 37 °C 62
Comparação entre os sistemas His-PEVA e His-Toyopearl
à temperatura ambiente e a 37 °C 65
4.3.4 – Análise de equilíbrio de adsorção considerando
as etapas de eluição e regeneração dos suportes 68

4.4. – Cinética de adsorção de IgG **70**

CAPÍTULO 5 – Conclusões e sugestões para os próximos trabalhos

5.1 – Conclusões **75**

5.2 – Sugestões para os próximos trabalhos **77**

CAPÍTULO 6 – Referências Bibliográficas **79**

ANEXO A **93**

ANEXO B **97**

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura de uma imunoglobulina G 8

Figura 2.2 – Esquema do tratamento extracorpóreo 9

Figura 2.3 – Esquema do princípio da cromatografia de afinidade 10

Figura 3.1 – Estrutura química do gel Toyopearl e da membrana de PEVA 31

Figura 3.2 – Estrutura proposta da matriz de pseudobioafinidade 33

Figura 3.3 – Adsorção de IgG humana pré-purificada em membranas His-PEVA e His-Toyopearl 36

Figura 3.4 – Esquema experimental para a obtenção de isotermas de adsorção 38

Figura 4.1 – Cromatografia de IgG pré-purificada em coluna contendo membranas His-PEVA 43

Figura 4.2 - Cromatografia de IgG pré-purificada em coluna contendo gel His-Toyopearl 43

Figura 4.3 - Cromatografia de IgG pré-purificada saturando a coluna contendo gel His-PEVA na presença do tampão Hepes pH 7,0 45

Figura 4.4. - Cromatografia de IgG pré-purificada saturando a coluna contendo gel His-Toyopearl na presença do tampãoHepes pH 7,0 46

Figura 4.5 – Eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida a 10% 48

Figura 4.6 – Eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida gradiente 4-15% 49

Figura 4.7 – Isoterma de adsorção de IgG, em duplicata, obtida à temperatura ambiente, para o suporte

His-Toyopearl utilizando tampão Hepes pH 7,0 50

Figura 4.8 – Região da isoterma de adsorção de IgG que segue o modelo de Langmuir para o suporte His-Toyopearl utilizando tampão Hepes pH 7,0 51

Figura 4.9 – Eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida gradiente 4-15%, para a membrana de PEVA (gel A) e para o gel Toyopearl (gel B) derivatizados e não derivatizados 54

Figura 4.10 - Cromatografia de IgG pré-purificada saturando a coluna contendo gel His-PEVA na presença do tampão Tris-HCl pH 7,4 55

Figura 4.11 - Cromatografia de IgG pré-purificada saturando a coluna contendo gel His-Toyopearl na presença do tampão Tris-HCl pH 7,4 56

Figura 4.12 – Isotermas de adsorção de IgG à temperatura ambiente para a membrana de PEVA não derivatizada e para His-PEVA 59

Figura 4.13 - Isotermas de adsorção de IgG à temperatura ambiente para o gel Toyopearl não derivatizado e para His-Toyopearl 61

Figura 4.14 – Região das isotermas de adsorção de IgG à temperatura ambiente que segue o modelo de Langmuir para o gel Toyopearl não derivatizado e para His-Toyopearl 61

Figura 4.15 - Isotermas de adsorção de IgG à temperatura de 37 °C para a membrana de PEVA não derivatizada e para His-PEVA 63

Figura 4.16 - Isotermas de adsorção de IgG à temperatura de 37 °C para o gel Toyopearl não derivatizado e para His-Toyopearl 64

Figura 4.17 – Isotermas de adsorção de IgG, à temperatura ambiente e à 37 °C para His-PEVA e His-Toyopearl 67

Figura 4.18 – Curvas cinéticas para o sistema His-PEVA, à temperatura ambiente, nas concentrações iniciais de 0,26, 3 e 7,3 mg/mL 71
Figura 4.19 - Curvas cinéticas para o sistema His-PEVA, à temperatura ambiente, nas concentrações iniciais de 0,26, 3 e 7,3 mg/mL 71
Figura 4.20 – Curvas cinéticas e teóricas para o sistema His-PEVA, à temperatura ambiente, nas concentrações iniciais de 0,26, 3 e 7,3 mg/mL 73
Figura 4.21 – Curvas cinéticas e teóricas para o sistema His-PEVA, à temperatura ambiente, nas concentrações iniciais de 0,26, 3 e 7,3 mg/mL 73
Figura A1 - Análise Scatchard, à temperatura ambiente, para o suporte His-Toyopearl, utilizando o tampão Hepes 25 mM pH 7,0 93
Figura A2 - Análise Scatchard, à temperatura ambiente, para o suporte His-PEVA e para a membrana de PEVA, utilizando o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4 94
Figura A3 - Análise Scatchard, à temperatura ambiente, para o suporte His-Toyopearl e para o gel Toyopearl, utilizando o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4 Inclui todos os pontos experimentais 94
Figura A4 - Análise Scatchard, à temperatura ambiente, para o suporte His-Toyopearl e para o gel Toyopearl, utilizando o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4 95
Figura A5 - Análise Scatchard, à temperatura de 37 °C, para o suporte His-PEVA e para a membrana de PEVA, utilizando o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4.... 96
Figura A6 - Análise Scatchard, à temperatura de 37 °C, para o suporte His-Toyopearl e para o gel Toyopearl, utilizando o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4 96
Figura B1 - Gráfico de Hill, à temperatura ambiente, para

o suporte His-PEVA, utilizando o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4 98

Figura B2 - Gráfico de Hill, à temperatura ambiente, para o suporte His-Toyopearl, utilizando o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4 98

Figura B3 - Gráfico de Hill, à temperatura de 37 °C, para o suporte His-PEVA, utilizando o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4 99

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Ligantes bioespecíficos e pseudobioespecíficos utilizados em sistemas de afinidade para a adsorção seletiva de auto-anticorpos 12

Tabela 2.2 – Capacidade de adsorção de IgG humana em proteína A e G, em função da matriz, método de ativação e densidade de ligantes 22

Tabela 2.3 – Capacidade de máxima e constante de dissociação de vários sistemas de afinidade que empregam membranas como matriz para a imobilização do ligante para a adsorção de IgG humana 27

Tabela 3.1 – Especificações dos suportes utilizados 30

Tabela 4.1 – Balanço de massa das cromatografias com IgG pré-purificada em His-PEVA e His-Toyopearl 44

Tabela 4.2 – Capacidade de adsorção dos suportes His-Toyopearl e His-PEVA obtidas de experimentos em modo frontal com tampão de adsorção Hepes pH 7,0 46

Tabela 4.3 – Quantidades de proteínas obtidas nos picos de eluição para o gel e a membrana derivatizados e não derivatizados. Experimentos com soro humano 53

Tabela 4.4 - Capacidade de adsorção dos suportes His-Toyopearl e His-PEVA obtidas de experimentos em modo frontal com tampão de adsorção Tris-HCl pH 7,4 56

Tabela 4.5 – Comparação das capacidade de adsorção dos suportes His-Toyopearl e His-PEVA empregando os tampões de adsorção Hepes pH7,0 e Tris-HCl pH 7,4 57

Tabela 4.6 – Parâmetros obtidos, à temperatura ambiente a partir do ajuste do modelo Langmuir aos dados das isotermas de adsorção dos suportes derivatizados

e não derivatizados 62

Tabela 4.7 – Parâmetros obtidos, à temperatura de 37 °C, a partir do ajuste do modelo Langmuir aos dados das isotermas de adsorção dos suportes derivatizados e não derivatizados 65

Tabela 4.8 - Parâmetros obtidos, à temperatura ambiente e à 37 °C, a partir do ajuste do modelo Langmuir aos dados das isotermas de adsorção dos suportes derivatizados 67

Tabela 4.9 - Capacidade de adsorção de IgG, à temperatura ambiente, para os suportes derivatizados e não derivatizados. Experimentos considerando as etapas de lavagem, eluição e regeneração 69

Tabela 4.10 - Valores das constantes cinéticas de adsorção e dessorção de IgG para os sistemas His-PEVA e His-Toyopearl 74

NOMENCLATURAS

LES = lupus eritematoso sistêmico

dsDNA = DNA de fita dupla ou nativo ("double stranded DNA")

ssDNA = DNA de fita simples ou desnaturados ("single stranded DNA")

ANCA = anticorpos anti- neutrofil citoplasmático

HLA = antígeno do leucócito humano

GBM = membrana basal glomerular

PVA = álcool poli vinílico

PEVA = álcool polietileno vinílico

His-PEVA = membranas de PEVA com histidina imobilizada

His-Toyopearl = gel Toyopearl com histidina imobilizada

kDa = 10^3 dalton

SDS-PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida usando dodecil sulfato de sódio

SDS = dodecil sulfato de sódio

Hepes = ácido hidroxietilpiperazinaetanosulfônico

Tris = hidroximetilaminometano

EDTA = ácido etilenodiamino tetracético

k_a = constante cinética de adsorção ($mL.min^{-1}.mg^{-1}$)

k_d = constante cinética de dessorção (min^{-1})

Q = quantidade de soluto adsorvido por massa ou volume de adsorvente ($mg.g^{-1}$ ou $mg.mL^{-1}$)

Q* = quantidade de soluto adsorvido em equilíbrio com a quantidade de soluto não adsorvido em solução ($mg.g^{-1}$ ou $mg.mL^{-1}$)

Q_m = capacidade máxima do adsorvente ($mg.g^{-1}$ ou $mg.mL^{-1}$)

Co = concentração inicial de proteína em solução ($mg.mL^{-1}$)

C = concentração de soluto livre em solução ($mg.mL^{-1}$)

C_{eq} = concentração de soluto em equilíbrio na solução ($mg.mL^{-1}$)

K_d = constante de dissociação ($mg.mL^{-1}$)

K = constante de Henry (mL.g de adsorvente^{-1})

K_a= constante de associação (M^{-1})

K_p = constante de equilíbrio proteína-proteína (M^{-1})

V = volume total no tanque (mL)

m = massa do adsorvente (g)

t = tempo (min)

Símbolos gregos

η = razão entre a massa ou volume do adsorvente e o volume de solução protéica no tanque (g de adsorvente.mL^{-1} ou admensional)

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 – Relevância da terapêutica das doenças auto-imunes

As doenças auto-imunes, que afetam de 5 a 7%, da população mundial, traduzem-se por distúrbios auto-imunitários em que o sistema imunológico se volta contra o próprio indivíduo. Dentre as doenças auto-imunes mais freqüentes estão a tireoidite autoimune, artrite reumatóide, púrpura trombocitopênica, miastenia gravis, lúpus eritematoso sistêmico (LES) e vasculite. Normalmente estas doenças são tratadas com a administração de medicamentos como corticosteróides ou imunossupressores que estabilizam a doença mas não a eliminam; além disso, a administração prolongada expõe o indivíduo a efeitos colaterais como toxicidade e riscos de deficiência imunitária (Fundenberg *et al.*, 1980).

Nas últimas três décadas tem sido investigado *in vitro* um método alternativo para tratar a fase aguda da doença auto-imune, o qual remove os auto-anticorpos do organismo através de um tratamento extracorpóreo do sangue do paciente, baseado na troca do plasma (plasmaferese) ou na adsorção seletiva do auto-anticorpo patogênico (Malchesky *et al.*, 1993).

Apesar da plasmaferese ser um método eficiente e bastante aplicado em uso clínico, alguns componentes do plasma do doador podem ocasionar efeitos colaterais, tais como, alergias, hipocalcemia, infecções virais e outras complicações. Devido a este fato os médicos têm empregado a terapia de adsorção seletiva de auto-anticorpos associada às drogas imunossupressoras (Yamazaki *et al.*, 1989, Ikonomov *et al.*, 1992).

Os sistemas de remoção de auto-anticorpos por adsorção seletiva geralmente empregam géis como matrizes de afinidade e vários ligantes têm sido empregados em tratamentos extracorpóreos, tais como: proteína A, fenilalanina, triptofano (Yamazaki *et al.*, 1989, Schneider *et al.*, 1990), sulfato de dextrana (Suzuki *et al.*, 1991) entre outros.

Capítulo 1

Atualmente a proteína A têm sido o ligante mais empregado, devido à sua alta especificidade por imunoglobulinas G, exibindo uma afinidade pelas subclasses IgG_1, IgG_2 e IgG_4 (Langone, 1982). Entretanto, sendo a maioria dos auto-anticorpos pertencentes às subclasses IgG_1 e IgG_3 (Maran *et al.*, 1997), a não adsorção da subclasse 3 da IgG torna a sua aplicação limitada para a remoção de auto-anticorpos. Além disso, ela adsorve não seletivamente outros componentes do plasma e apresenta alta toxicidade no caso de desprendimento da matriz, podendo ocasionar danos ao paciente. Trabalhos prévios têm verificado que o aminoácido histidina imobilizado em membranas de fibras ocas de álcool polietileno vínilico (PEVA) apresenta afinidade pelas subclasses IgG_1, IgG_2, e inclusive a IgG_3, a qual não é adsorvida pela proteína A (Bueno *et al.*, 1995A). Além disso, experimentos *in vitro* mostraram que matrizes contendo este ligante adsorvem anticorpos anti-fosfolípides (Darnige *et al.*, 1999), anti-DNA, anti-Sm/RNP, anti-SS-A/Ro e anti-Sm presentes em pacientes com doenças auto-imunes (Ventura, 2000).

Apesar de vários adsorventes de afinidade demonstrarem eficiência para a remoção de auto-anticorpos, parâmetros como a capacidade máxima de adsorção do suporte e constante de dissociação entre o auto-anticorpo e o ligante são extremamente importantes para avaliar o desempenho dos sistemas. A determinação destes parâmetros é difícil, quando se visa como aplicação o tratamento extracorpóreo já que a remoção de auto-anticorpos é feita a partir do plasma humano, uma solução rica em proteínas. Geralmente o adsorvente é avaliado para a adsorção de IgG humana pura, podendo servir como base para a remoção de auto-anticorpos, os quais pertencem em sua maioria à classe G das imunoglobulinas (Maran *et al.*, 1997).

Diante deste fato, as pesquisas voltadas para a determinação de parâmetros que demonstrem o desempenho dos adsorventes de afinidade na adsorção de IgG, são de extrema importância na escolha do sistema mais adequado a ser aplicado.

1.2 - Objetivo e etapas da pesquisa

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a adsorção de IgG em dois sistemas de afinidade, a fim de obter parâmetros relevantes para a escolha do adsorvente adequado, visando a aplicação em tratamentos extracorpóreos. O aminoácido histidina foi empregado como ligante alternativo à proteína A, devido a vantagens como: baixo custo, alta capacidade, facilidade de regeneração, boa estabilidade, baixa toxicidade e afinidade pela IgG_3, além de adsorver auto-anticorpos presentes em pacientes com doenças auto-imunes (Ventura, 2000). Como no tratamento extracorpóreo são exigidas elevadas vazões de fluxo e estas condições ocasionam problemas de compressibilidade nos géis tradicionais (Horstmann *et al.*, 1986 e Charcosset *et al*, 1995), optou-se por empregar membranas e géis rígidos como matrizes para a imobilização do ligante. Membranas de fibras ocas de álcool poli etileno vinílico (PEVA) foram selecionadas, por demonstrarem um potencial para adsorver auto-anticorpos (Ventura, 2000) e o gel Toyopearl HW-65F, por ser um gel rígido o bastante para permitir altas velocidades superficiais e suportar pressões moderadas. Além disso, este gel é poroso, bastante hidrofílico e contém numerosos grupos hidroxilas facilitando a ativação por vários tipos de reagentes (Hermanson *et al.*, 1992).

A comparação entre os adsorventes foi baseada na seletividade, capacidade de adsorção, constante de dissociação e cinética de adsorção dos suportes. Apesar das membranas de afinidade apresentarem como vantagem em relação aos géis convencionais, o fluxo convectivo de proteína para o interior dos poros, o desempenho da adsorção de proteína foi analisado para ambos suportes sob condições de equilíbrio. Como consequência, a capacidade de adsorção foi avaliada em função das interações específicas e não-específicas de proteína com o ligante e a matriz e da densidade de ligantes. Através dos parâmetros cinéticos pôde-se verificar em que sistema a proteína foi mais fracamente adsorvida. Embora tenha sido utilizado o mesmo procedimento de ativação e imobilização do ligante histidina, outros fatores como a porosidade e a estrutura das matrizes podem influenciar na distribuição e densidade de ligantes, ocasionado variações não só na capacidade de adsorção como na força de interação entre a proteína e o ligante.

Capítulo 1

A seguir estão apresentadas as etapas para a realização deste trabalho :

1 - Ativação e imobilização de histidina em membranas de álcool polietileno vinílico (PEVA) e no gel Toyopearl HW-65F, seguido pela determinação da densidade de ligantes imobilizados.

2 - Verificação da adsorção de IgG humana nos suportes ativados His-PEVA e His-Toyopearl utilizando o tampão Hepes 25 mM a pH 7,0.

3 - Verificação da seletividade dos suportes His-PEVA e His-Toyopearl, para adsorção de IgG frente às proteínas do soro humano, na presença do tampão Hepes a pH 7,0 e na presença do tampão Tris-HCl a pH 7,4.

4 - Análise de equilíbrio de adsorção em tanques agitados à temperatura ambiente e à 37 °C, utilizando o tampão Tris-HCl a pH 7,4, para a determinação da capacidade máxima e da constante de dissociação dos suportes His-PEVA e His-Toyopearl. Esta análise também foi realizada para as matrizes (membrana de PEVA e gel Toyopearl) sem derivatização, com a finalidade de verificar se havia adsorção não-especifica de IgG na matriz.

5 - De acordo com os resultados obtidos no item 4, foram realizados experimentos de equilíbrio de adsorção em tanques agitados à temperatura ambiente, efetuando as etapas de lavagem, eluição e regeneração, nas matrizes com e sem o ligante histidina imobilizado, para obter a quantidade de proteína adsorvida especificamente pelos suportes;

6 - Experimentos cinéticos foram realizados, à temperatura ambiente, na presença do tampão Tris-HCl a pH 7,4, para determinar as constantes cinéticas de adsorção (k_a) e dessorção (k_d) do complexo IgG-histidina nos suportes His-PEVA e His-Toyopearl. Estes parâmetros são de grande importância para ampliação de escala e para uma futura modelagem e otimização de um tratamento extracorpóreo.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Doenças auto-imunes

O equilíbrio fisiológico do sistema imunitário é caracterizado pela existência de tolerância aos antígenos do próprio corpo. Uma ruptura desta tolerância provoca a ativação de anticorpos auto-reativos surgindo uma série de reações de auto-agressão no organismo que desencadeiam doenças chamadas de auto-imunes. As doenças auto-imunes podem ser classificadas como: **doenças de órgão específico** direcionadas a antígenos específicos de um determinado órgão, por exemplo a tireoidite de Hashimoto, que atinge a glândula tiróide; **doenças intermediárias** dirigidas a antígenos de um órgão e a outros antígenos do organismo, por exemplo a síndrome de Sjögren contra as mitocôndrias e o epitélio ducto salivar e **doenças sistêmicas** que envolvem vários anticorpos contra diferentes elementos celulares podendo atingir qualquer órgão, como por exemplo, o lúpus eritematoso sistêmico, cujos antígenos podem ser o DNA, complexos proteína-DNA, cardiolipina e outros (Calich e Cappivaz, 1989).

A quebra de tolerância imunológica pode ser explicada através dos seguintes mecanismos (Calich e Cappivaz, 1989):

- Modificações na estrutura dos auto-antígenos, devido a processos físicos, originando novos antígenos que favorecem a produção de auto-anticorpos;
- Contato de certos antígenos, confinados em locais especiais, com o sistema imune, provocando uma resposta imune com a produção de auto-anticorpos;
- Reações cruzadas entre anticorpos e auto-antígenos que possuem estrutura semelhante aos antígenos estranhos;

- Alterações no sistema linfóide relacionadas com a hereditariedade ou com a presença de agentes infecciosos e drogas, produzindo anticorpos que reagem com os auto-antígenos.

Além destes, tem sido relatado também que distúrbios emocionais podem ser relevantes para o desencadeamento da doença (Chevalier *et al.*, 1990).

Para um melhor entendimento sobre as doenças auto-imunes é necessário um estudo mais detalhado sobre os agentes responsáveis pelo desencadeamento da doença, os auto-anticorpos.

2.2- Auto-anticorpos

2.2.1 – Definição e estrutura

Os anticorpos e auto-anticorpos são imunoglobulinas, ou seja, glicoproteínas compostas de 82 a 96% de polipeptídios e 4 a 18% de carboidratos, normalmente produzidos devido a uma perturbação no sistema imunológico. Toda molécula de imunoglobulina é composta de duas cadeias leves (L) idênticas, de massa molecular 23 kDa e duas cadeias pesadas (H) idênticas, de massa molecular 53 a 75 kDa, unidas intracadeia por ligações dissulfeto. A região do domínio N-terminal das cadeias leves (L) e pesadas (H) é variável (V) e está associado à ligação do antígeno, as demais regiões são constantes (C). A digestão de uma imunoglobulina pela enzima papaína divide a molécula em dois fragmentos denominados Fab ("antigen-binding", ligação do antígeno), que está associado à ligação do antígeno e um fragmento cristalizável Fc, que envolve as atividades biológicas secundárias das imunglobulinas como a fixação de complemento (Murray *et al.*, 1993 e Stites e Terr, 1992). A Figura 2.1 representa a estrutura simplificada de uma imunoglobulina G.

Devido às diferenças estruturais nas regiões constantes das imunoglobulinas, são encontradas em seres humanos cinco classes: **imunoglobulinas G (IgG)** de massa molecular em torno de 150 kDa (a mais abundante no soro, normalmente produzida nos últimos estágios da resposta imune); **imunoglobulinas A (IgA)** monomérica com massa molecular de 160 kDa ou polimérica de massa molecular 400 kDa (atuam no sistema de

defesa do organismo contra infeções locais); **imunoglobulinas M (IgM)** de massa molecular próxima de 900 kDa (atuam no início da resposta imune contra a maioria dos antígenos); **imunoglobulinas D (IgD)** de massa molecular aproximadamente 180 kDa (geralmente encontradas em pequenas quantidades no soro, porém sua principal função ainda não está bem definida) e **imunoglobulinas E (IgE)** com massa molecular 190 kDa (atuam no sistema imunológico, provocando reações de rubor e edema, na pele de indivíduos alérgicos a determinadas substâncias específicas). Também são encontradas quatro subclasses de IgG, IgG_1, IgG_2, IgG_3 e IgG_4 e duas subclasses de IgA, IgA_1 e IgA_2 (Stites e Terr, 1992).

Os auto-anticorpos produzidos durante uma resposta imune pertencem principalmente às classes IgG, IgM e IgA (Murray *et al.*, 1993) e alguns pesquisadores tem identificado as subclasses de imunoglobulinas G, que constituem vários auto-anticorpos presentes tanto em doenças auto-imunes de órgão específico como de órgão não específico (Maran *et al.*, 1997). Em pacientes com artrite reumatóide foram encontrados auto-anticorpos pertencentes às subclasses IgG_1 e IgG_4; no lúpus eritematoso sistêmico foram encontrados anticorpos anti-dsDNA ("double stranded DNA"ou anticorpos anti-DNA de fita dupla ou nativo) pertencentes a todas subclasses, com uma predominância das subclasses IgG_1 e IgG_3; nos casos de infertilidade em homens e mulheres, estão presentes anticorpos anti-espermatozóides do tipo IgG_1 e IgG_3; em glomerunefrite são encontrados anticorpos anti-membrana basal glomerular, pertencentes à classe IgM e às subclasses IgG_1 e IgG_3 e em diabete mellitus existe uma maior incidência de auto-anticorpos do tipo IgG_1. De uma maneira geral, foi verificado que os auto-anticorpos pertencem, em sua maioria, às subclasses IgG_1 e IgG_3, visto a presença destas em níveis elevados, durante a fase ativa de várias doenças auto-imunes (Maran *et al.*, 1997).

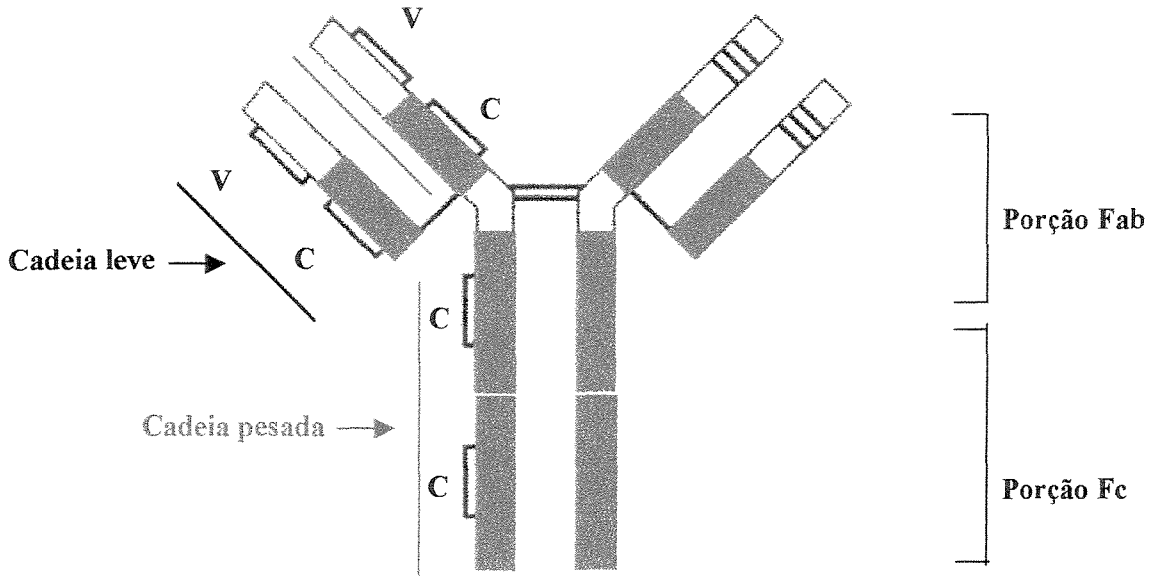


Figura 2.1 : Estrutura de uma imunoglobulina G (Revillard, 1994)

Até o momento, sabe-se que as doenças auto-imunes não tem cura, entretanto tem sido desenvolvido, ao longo dos anos, alguns métodos de tratamento que possuem como finalidade, eliminar pelo menos parcialmente os sintomas da doença.

2.3- Tratamento das doenças auto-imunes

As doenças auto-imunes são comumente tratadas com a administração de drogas imunossupressoras, que podem ser corticosteróides, os quais reduzem a quantidade de anticorpos ligados à células-alvo ou agentes citotóxicos, que reduzem as células imunologicamente ativas que tenham capacidade de replicação. Apesar das drogas imunossupressoras serem amplamente utilizadas, não eliminam a doença e podem causar sérios efeitos colaterais tais como: a depressão da medula óssea (neutropenia, trombocitopenia), distúrbios gastrointestinais e esterilidade em homens e mulheres (Fudenberg *et al.*, 1980). Devido a este fato, atualmente vários médicos têm empregado,

como método alternativo, o tratamento extracorpóreo, como adjuvante às drogas imunossupressoras (Jones *et al.*, 1981).

A remoção de auto-anticorpos a partir de um tratamento extracorpóreo do sangue do paciente pode ser realizada de duas maneiras: pela troca do plasma (plasmaferese) ou por adsorção seletiva dos anticorpos patogênicos (Figura 2.2). A plasmaferese consiste na passagem do sangue do paciente através de um sistema, que separa o plasma dos elementos figurados do sangue (glóbulos brancos, vermelhos e plaquetas). Os elementos figurados retornam imediatamente ao paciente enquanto que o plasma é descartado e substituído pelo plasma de um indivíduo sadio ou por uma solução de albumina. Quando o plasma do paciente é totalmente substituído pelo do doador, proteínas estranhas são inseridas no paciente, podendo ocasionar alergias, infecções virais como a hepatite ou mesmo infeções bacterianas (Singer *et al.*, 1987, Kinoshita *et al.*, 1989, Suzuki *et al.*, 1991, Ikonomov *et al.*, 1992). Além disso, a troca de três a cinco litros de plasma, durante repetidas plasmafereses em curtos intervalos de tempo, pode ocasionar a diminuição de proteínas biologicamente ativas levando a coagulação do sangue (Sultan *et al.*, 1979).

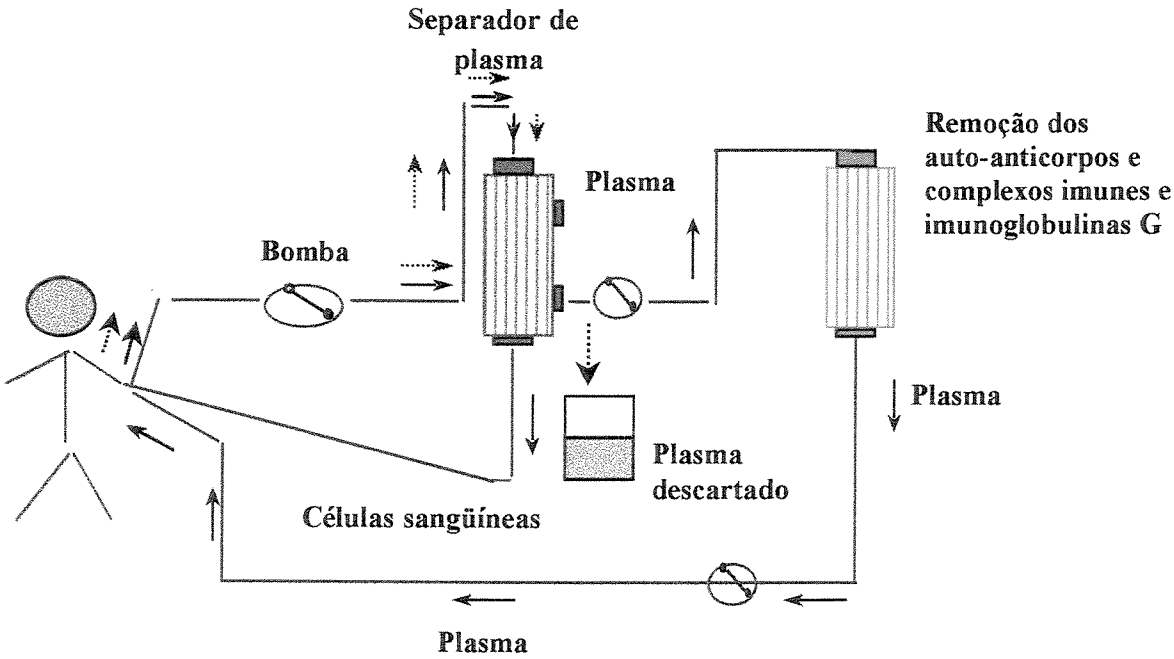


Figura 2.2 – Esquema do tratamento extracorpóreo: plasmaferese (⇢) e adsorção seletiva(⟶).

Na terapia por adsorção seletiva, o plasma do paciente, separado previamente do sangue, passa através de uma coluna de afinidade, na qual são removidos somente os anticorpos patogênicos, retornando para o paciente um plasma tratado, sem a perda dos seus componentes essenciais. Este método é baseado no princípio da cromatografia de afinidade (Figura 2.3), onde substâncias biológicas ou não biológicas, chamadas de ligantes, são imobilizadas covalentemente em suportes sólidos (partículas ou membranas microporosas). As moléculas que possuem afinidade pelo ligante são adsorvidas (auto-anticorpos), enquanto que as outras moléculas não adsorvidas retornam ao paciente sem qualquer modificação. Caso se deseje recuperar o composto adsorvido, muda-se as condições da coluna como pH, força iônica ou temperatura (Vijayalakshimi, 1989).

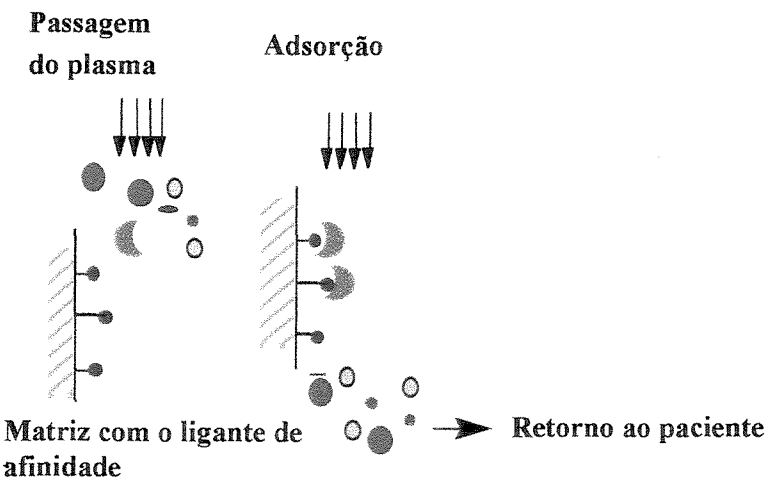


Figura 2.3 : Esquema do princípio da cromatografia de afinidade

Nos processos de adsorção seletiva são empregados dois tipos de ligantes com afinidade pela proteína de interesse: os bioespecíficos e os pseudobioespecíficos (Vijayalakshmi, 1989). Os ligantes bioespecíficos, geralmente, são macromoléculas biológicas como anticorpos monoclonais, DNA e proteína A, com alta especificidade pela molécula de interesse. No entanto, esses ligantes são frágeis, difíceis de imobilizar nos suportes sólidos e tóxicos no caso de serem desprendidos da matriz, podendo ocasionar sérios problemas ao paciente. Como alternativa, tem sido empregado ligantes

pseudobioespecíficos, tais como os aminoácidos fenilalanina e triptofano. Estes ligantes, apesar de apresentarem uma especificidade menor que os bioespecíficos, são mais estáveis, de baixo custo e menos tóxicos no caso de desprendimento da matriz.

Alguns exemplos do emprego *in vivo* ou *in vitro* de ligantes bioespecíficos ou pseudobioespecíficos para a remoção seletiva de auto-anticorpos, complexos imunes e imunoglobulinas, visando o tratamento extracorpóreo de pacientes com doenças auto-imunes são apresentados na Tabela 2.1.

Como observado na Tabela 2.1, nas décadas de 70 e 80, alguns pesquisadores como Terman *et al.*, 1976, 1977, 1979 e Habib *et al.*, 1984 obtiveram resultados promissores com o emprego de DNA como ligante, imobilizado em suportes sólidos para a remoção de anticorpos anti-DNA, presentes em amostras séricas de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Entretanto, os trabalhos não evoluíram, provavelmente devido a dificuldade de imobilizar a molécula de DNA através de uma ligação estável, uma vez que esta possui alta massa molecular. O desprendimento do DNA do suporte induziria a síntese de auto-anticorpos anti-DNA, aumentando, consequentemente, a sua concentração na circulação do paciente.

O ligante bioespecífico proteína A tem sido o mais empregado para a remoção de auto-anticorpos, devido a alta especificidade deste por imunoglobulinas da classe G. A proteína A é um receptor bacteriano encontrado na superfície da parede celular ou secretado pela maioria das linhagens de bactérias *Staphylococcus aureus*. Esta proteína possui afinidade pela região Fc das subclasses IgG_1, IgG_2 e IgG_4, não se ligando à subclasse IgG_3 (Langone, 1982). Como a maioria dos auto-anticorpos presentes em doenças sistêmicas são do tipo IgG_1 e IgG_3 (Maran *et al.*, 1997), a não adsorção desta subclasse resulta em uma desvantagem. Além de ligar-se à região Fc da IgG, Lindmark *et al.*, 1983, Boyle e Reis, 1987 e Ikomonov *et al.*, 1992 têm observado a interação de IgM, IgA e IgE com esse ligante (ligação ao fragmento $F(ab')_2$).

A proteína A tem sido bastante utilizada clinicamente como ligante no tratamento extracorpóreo de doenças auto-imunes e na prevenção de rejeições pós-transplantes. No entanto, o seu benefício é questionável, uma vez que esta proteína apresenta problemas de toxicidade se desprendida da matriz, podendo ocasionar sérios efeitos colaterais como vômitos, febres, hipertensão, hipotensão e dispnéia (Arbiser *et al.*, 1995). Segundo Fuglistaller, 1989, que testou alguns adsorventes de afinidade comercialmente disponíveis,

Tabela 2.1: Ligantes bioespecíficos e pseudobioespecíficos utilizados em sistemas de afinidade para adsorção seletiva de auto-anticorpos

		Matriz	Auto-anticorpo Removido	Aplicação	Experimento	Fonte
Ligantes Bioespecíficos	dsDNA[1] e ssDNA[2]	Partículas de agarose Partículas de carvão Membranas de colágeno	Anti-dsDNA e anti-ssDNA	LES[3]	*In vitro* com soro humano e *in vivo* em humanos, coelhos e cães	Terman *et al.*, 1976, 1977, 1979 Habib *et al.*, 1984
		Partículas de agarose e de sílica	Anti-dsDNA e ANCA[4]	LES[3] e glomerunefrite	*In vitro* com plasma humano e *in vivo* em humanos	Ikonomov *et al.*, 1992 Palmer *et al.*, 1988 Esnault *et al.*, 1993
		Partículas de agarose	Anti-acetilcolina[5],	Miastenia gravis	*In vitro* com plasma humano *e in vivo* em humanos	Berta *et al*, 1994 Ikonomov *et al.*, 1992 Antozzi *et al.*, 1994
	Proteína A	Partículas de agarose e de sílica	Anti-HLA[6]	Prevenção de rejeição pós transplante de coração e rins	*In vivo* em humanos	Olivari *et al.*, 1994 Ruiz *et al.*, 1994 Persson *et al.*, 1995; Mastrangelo *et al.*, 1995
			Anti-plaquetas	Púrpura trombocitopênica	*In vivo* em humanos	Cahill *et al.*, 1998 e Balint *et al.*, 1991 Kabisch *et al.*, 1994
		Partículas de sílica	Fator reumatóide e complexos imunes	Artrite reumatóide	*In vivo* em humanos	Wiesenhutter *et al.*, 1994
		Partículas de agarose	Anti-GBM [7]e complexos imunes	LES, artrite reumatóide, síndrome de Goodpasture	*In vitro* com plasma humano	Ikonomov *et al.*, 1992 Bygren *et al.*, 1985

Continuação da Tabela 2.1: Ligantes bioespecíficos e pseudobioespecíficos utilizados em sistemas de afinidade para adsorção seletiva de auto-anticorpos

		Matriz	Auto-anticorpo removido	Aplicação	Experimento	Fonte
Ligantes Bioespecíficos	Proteína G	Membrana plana partículas de agarose	IgG		*In vivo* em humanos, in vitro com soro humano	Hou e Hou, 1989 Barocci e Nocera, 1993
Ligantes Pseudo-bioespecíficos	Sulfato de dextrana	Partículas de celulose	Anti-dsDNA e Anti-ssDNA	LES[3]	*In vitro* com plasma humano e *in vivo* em humanos	Kinoshita *et al.*, 1989 Suzuki *et al.*, 1991
	Triptofano	Partículas de PVA	Anti-acetilcolina[5], anti-GM1[8] Anti-acetilcolina, Fator reumatóide Anti-DNA	Miastenia gravis Sindrome de Guillain Barré Artrite reumatóide e LES	*In vitro* com plasma humano *e in vivo* em humanos	Hosokawa e Oyamaguchi, 1990 Hirai *et al.*, 1998 Yamazaki *et al.*, 1989 Ikomonov *et al.*, 1992
	Fenilalanina	Partículas de PVA	Anti-dsDNA e Complexos imunes	LES[3]	*In vitro* com soro humano *e In vivo* em humanos	Schneider *et al.*, 1990 Ikomonov *et al.*, 1992
	Fenilalanina e triptofano	Partículas de PVA	Anti-gangliosídeos[9]	Síndrome de Güillain-Barré	*In vivo* em humanos	Tagawa *et al.*, 1998
	Histidina	Membranas de PEVA	Anti-dsDNA, anti-Sm[10], anti-Sm/RNP[11], anti-SS-A/Ro[12], Anti-fosfolipídios[13]	LES[3]	*In vitro* com plasma humano	Ventura, 2000 Darnige *et al.*, 1999

1- dsDNA = DNA de fita dupla ou nativo ("double stranded DNA"); 2- ssDNA=DNA de fita simples ou desnaturados ("single stranded DNA"); 3- LES = lúpus eritematoso sistêmico; 4- ANCA = anticorpos anti-neutrophil cytoplasmático; 5- anti-acetilcolina= contra o receptor acetilcolina na junção neuromuscular de músculos estriados; 6- anticorpos anti-HLA = contra HLA, antígeno leucócito humano; 7- anti-GBM = anticorpos anti-membrana basal glomerular; 8- anti-GM1 = contra o gangliosídeo GM1 que são antígenos do nervo periferal; 9-anti-gangliosídeos= contra gangliosídeos que são componentes da superfície celular do nervo periferal; 10- Anti-Sm = anticorpos contra o antígeno Sm (Smith), complexo constituído de várias proteínas associadas a RNA; 11- Anti-Sm/RNP = anticorpos contra o complexo Sm-RNP; 12- Anti-SS-A/Ro = anticorpos encontrados em pacientes com síndrome de Sjögren, é idêntico ao Ro; 13- anticorpos anti-fosfolipídios= contra cardiolipina.

os maiores desprendimentos de proteína A ocorreram em valores elevados de pH e as ligações mais estáveis ocorreram em matrizes nas quais a proteína A foi ligada através de um grupamento alquilamina ou éter.

A proteína G, extraída da parede celular de um grupo de bactérias G *Streptococus*, apresenta uma seletiva reatividade com IgG, ligando-se à parte Fc destas imunoglobulinas e adsorvendo todas as subclasses, inclusiva a IgG_3 (não adsorvida pela proteína A) (Mandaro *et al.*, 1987). Apesar de vários pesquisadores terem demonstrado a eficiência da utilização de adsorventes derivatizados com proteína G em tratamento extracorpóreo para a remoção de IgG, não há relatos do seu emprego, talvez devido a sua toxicidade no caso de desprendimento e ao seu custo elevado (Hou e Hou, 1989, Barocci e Nocera, 1993).

Ligantes pseudobioespecíficos têm sido empregados no tratamento extracorpóreo de pacientes com doenças auto-imunes como uma alternativa aos ligantes bioespecíficos e à troca de plasma. Apesar destes ligantes apresentarem especificidade menor que os ligantes bioespecíficos, o fato de serem menos tóxicos e de custo reduzido, os tornam vantajosos para esta aplicação. O sulfato de dextrana, o qual adsorve especificamente lipoproteínas de baixa densidade (LDL), mostrou eficiência para a remoção de anticorpos anti-dsDNA de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (Kinoshita *et al.*,1989 e Suzuki *et al.*, 1991). Entretanto, por ser uma molécula carregada negativamente, este ligante apresenta como desvantagem, a adsorção não seletiva de outras proteínas do plasma, tornando necessário o emprego de fluidos de substituição.

Os aminoácidos triptofano e fenilalanina imobilizados em géis de álcool polivinílico (PVA) foram introduzidos na década de 70 como imunoadsorventes, eliminando vários tipos de auto-anticorpos, complexos imunes e fator rematóide através de interações hidrofóbicas. Como estes aminoácidos são encontrados fisiologicamente no organismo, não acarretam danos ao paciente no caso de desprendimento da matriz. Embora seja comprovada a biocompatibilidade destes ligantes para aplicações clínicas, segundo Schneider, 1998, as colunas não são regeneráveis, podendo ser utilizada apenas em uma sessão extracorpórea, e além disso, estes ligantes não são muito seletivos (Ikomonov *et al.*, 1992).

O aminoácido histidina tem mostrado afinidade pela parte Fab das subclasses IgG_1, IgG_2, inclusive IgG_3, a qual não é adsorvida pela proteína A (Bueno *et al.*, 1995A). O mecanismo de interação de imunoglobulinas humana com este ligante ainda não está

completamente elucidado, mas sabe-se que tanto interações hidrofóbicas como forças eletrostáticas podem estar predominantemente envolvidas na interação. A utilização deste aminoácido como ligante, que apresenta uma estrutura química simples, tem um grande número de vantagens sobre os outros ligantes, como baixa toxicidade, baixo custo, alta capacidade, resistente à degradação química ou biológica durante a estocagem, boa estabilidade, entre outras (Bueno *et al.*, 1995B). Trabalhos *in vitro* utilizando este ligante imobilizado em membranas de álcool polietileno vinílico tem relatado a habilidade deste ligante para adsorção de auto-anticorpos presentes em pacientes com LES, apresentando, assim, potencialidade de aplicação no tratamento extracorpóreo de doenças auto-imunes (Darnige *et al.*, 1999 e Ventura, 2000).

Como visto, vários ligantes têm sido empregados na remoção seletiva de anticorpos patogênicos por tratamento extracorpóreo. Para comparar o desempenho de um novo sistema de afinidade com os existentes, vários parâmetros devem ser considerados tais como, a matriz de afinidade a ser empregada, a estabilidade da ligação matriz-ligante, a seletividade, a capacidade máxima de adsorção do sistema, bem como as constantes cinéticas de associação e dissociação da molécula de interesse no ligante imobilizado. A determinação de parâmetros que descrevem a adsorção de auto-anticorpos não é uma tarefa fácil, já que são utilizados amostras séricas de pacientes, uma solução complexa com várias proteínas. Devido a este fato, alguns pesquisadores costumam avaliar o comportamento de adsorção dos sistemas empregando soluções de imunoglobulina G pré-purificada a partir de amostras séricas de indivíduos sadios. Como a maioria dos auto-anticorpos pertencem às classes IgG e IgM, os parâmetros analisados podem ser utilizados como base para avaliar o desempenho destes sistemas durante o tratamento extracorpóreo por adsorção seletiva.

2.4 –Adsorção em sistemas de afinidade

O fenômeno da adsorção é caracterizado pela concentração preferencial de uma espécie na interface entre duas fases. Dois tipos de adsorção podem ocorrer em uma superfície sólida: a adsorção física que envolve forças intermoleculares ou a adsorção química (quimosorção) que envolve interações químicas com a formação de produtos (Hill, 1997). Nos adsorventes de afinidade, as interações são baseadas em fenômenos físicos, os

quais podem ser avaliados de acordo com os princípios de adsorção entre a proteína e o ligante imobilizado em um suporte sólido.

2.4.1 – Princípios da adsorção

Nos processos de separação por afinidade, um adsorvente contendo um ligante imobilizado pode interagir reversivelmente com uma molécula de interesse formando um complexo não covalente (exceção na cromatografia covalente). Assumindo que o adsorvente tem afinidade por apenas uma espécie do adsorvato, o equilíbrio pode ser descrito pela seguinte equação (Chase, 1984) :

$$\textbf{ligante + proteína} \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} \textbf{complexo proteína-ligante} \qquad (2.1)$$

Onde k_a e k_d são respectivamente, as constantes cinéticas de adsorção e dessorção do complexo AB. Estas constantes também representam as contribuições da resistência à transferência de massa da fase líquida para o sítio de adsorção, resistência à difusão nos poros e resistência à reação na superfície, fenômenos que controlam a transferência de massa nestes sistemas (Chase, 1984).

Segundo Chase, 1984, a taxa de variação da quantidade de soluto no adsorvente, obtida pelo balanço de massa do soluto na fase sólida, pode ser descrita pela equação 2.2.

$$dQ/dt = k_a C (Q_m - Q) - k_d Q \qquad (2.2)$$

Onde Q é a quantidade de soluto adsorvido por massa ou volume de adsorvente ($mg.g^{-1}$ ou $mg.mL^{-1}$), C é a concentração de soluto livre em solução ($mg.mL^{-1}$), Q_m é a capacidade máxima do adsorvente ($mg.mL^{-1}$ ou $mg.g^{-1}$) e t é o tempo (min). Esta equação descreve a cinética de adsorção do sistema e permite a determinação das constantes cinéticas de adsorção (k_a, $mL.min^{-1}.mg^{-1}$) e dessorção (k_d, min^{-1}).

Em situação de equilíbrio do sistema, tem-se :

$$\frac{dQ}{dt} = 0 = k_a C_{eq} (Q_m - Q^*) - k_d Q^* \qquad (2.3)$$

Rearranjando a equação 2.3, tem-se :

$$Q^* = \frac{Q_m C_{eq}}{K_d + C_{eq}} \qquad (2.4)$$

Onde Q* é a quantidade de soluto adsorvido por massa ou volume de adsorvente, em equilíbrio com a quantidade de soluto não adsorvido em solução ($mg.g^{-1}$ ou $mg.mL^{-1}$), C_{eq} é a concentração de soluto em equilíbrio na solução ($mg.mL^{-1}$) e $K_d = k_d/k_a$ é a constante de dissociação da reação em equilíbrio ($mg.mL^{-1}$). A determinação dos parâmetros Q_m e K_d são de grande importância para descrever o desempenho do sistema matriz-ligante na adsorção da proteína desejada.

A equação 2.4 representa a isoterma do tipo Langmuir, a qual descreve o equilíbrio de adsorção da maioria dos sistemas de afinidade. Para a utilização desta equação são assumidas as seguintes hipóteses: a adsorção é reversível e limitada a uma camada, a superfície interna do sólido é homogênea e apresenta um número finito de sítios ativos; as moléculas adsorvidas não interagem entre si e não há adsorção competitiva. (Langmuir, 1916).

Entretanto, dependendo do sistema, o comportamento de adsorção pode não ser caracterizado pelo modelo de Langmuir. Por exemplo, as isotermas de adsorção lineares podem ser representadas pela equação :

$$Q = KC \qquad (2.5)$$

\Onde o K é a constante de Henry ($mL.g\ adsorvente^{-1}$), a qual não dá informação sobre a energia de interação que atua no sistema.

Um modelo de multicamadas, proposto por Langmuir, 1918, pode também ser empregado como alternativo para sistemas que não apresentam um comportamento langmuriano. Neste modelo é considerado que a formação de multicamadas ocorre devido a

interações idênticas entre adsorvato-adsorvato e pode ser representado através da seguinte equação :

$$Q = \frac{Q_m K_a}{1/C_{eq} + K_a - 2K_p + (K_p^2 - K_p K_a)C_{eq}} \quad (2.6)$$

Onde: K_p é a constante de equilíbrio proteína-proteína (M^{-1}) e K_a é a constante de associação proteína-ligante (M^{-1}).

As isotermas de equilíbrio podem ser obtidas através de experimentos em batelada (tanques agitados), onde uma quantidade conhecida do adsorvente é contactada a várias concentrações do adsorvato até ser atingido o equilíbrio entre a concentração de proteína na fase líquida e na fase sólida (adsorvente) ou através do método cromatográfico frontal, com ou sem recirculação do adsorvato, através de uma coluna contendo o adsorvente, até obter o equilíbrio (Cowan *et al.*, 1989).

Em experimentos de adsorção realizados em tanques agitados, a massa de proteína adsorvida na matriz pode ser determinada através da diferença entre as concentrações iniciais e finais do sobrenadante (balanço de massa no tanque), resultando na equação:

$$Q = \frac{V}{m}(Co - C_{eq}) \quad (2.7)$$

Onde: V é o volume total no tanque (mL); m é a massa do adsorvente (g), Co é a concentração inicial de proteína em solução (mg/mL).

Para descrever a cinética de adsorção e dessorção em tanques agitados Skidmore *et al.*, 1990 apresentou uma expressão para a taxa de variação da concentração de proteína na fase líquida com o tempo, utilizando as equações 2.2 e 2.7, resultando em:

$$dC/dt = -(k_a Q_m \eta)C + k_a(Co-C)C + (k_a K_d)(Co-C) \quad (2.8)$$

Onde: η é a razão entre a massa ou o volume do adsorvente e o volume de solução protéica no tanque. Neste modelo, a taxa de reação é considerada baixa em comparação com a transferência de massa, de maneira que a concentração de proteína pode ser considerada a

mesma fora e no interior dos poros da partícula do adsorvente. A expressão a seguir mostra a solução analítica da equação 2.8 apresentada por Skidmore *et al.*, 1990.

$$C = Co - \eta \left[\frac{(b+a)(1-\exp(-2ak_a\eta t))}{(b+a) - \exp(-2ak_a\eta t)(b-a)} \right] \quad (2.9)$$

Onde:

$$a^2 = b^2 - (Co/\eta)Q_m \quad (2.10)$$

$$b = 1/2(Co/\eta + Q_m + K_d/\eta). \quad (2.11)$$

Os modelos matemáticos são ajustados aos dados experimentais e os parâmetros determinados são funções das interações envolvidas entre a molécula a ser adsorvida, a matriz, o braço espaçador e o ligante, a densidade de ligante imobilizado e as condições operacionais. Durante a cromatografia de afinidade, a proteína pode ser adsorvida através de interações hidrofóbicas, eletrostáticas, por transferência de carga, por ligações de hidrogênio ou por uma combinação destas interações. Como é desejável uma interação específica entre a proteína e o ligante, os suportes e os braços espaçadores a serem empregados devem ser altamente hidrofílicos (Andrade e Hlady, 1986 e Hermanson *et al.*, 1992). Além da interação específica, é essencial que o suporte de afinidade possa operar a altas vazões, empregando-se pressões moderadas, sem o aparecimento de caminhos preferenciais e sem apresentar perda da capacidade de adsorção.

Membranas microporosas e géis rígidos têm sido introduzidos como suportes cromatográficos para imobilização de ligantes de afinidade com a finalidade de possibilitar operações a vazões elevadas. Como no tratamento extracorpóreo é necessário operar a altas vazões, a investigação *in vitro* destes sistemas têm sido realizada nas últimas décadas para posterior uso clínico. Apesar de ambos sistemas suportarem as mesmas condições operacionais, as membranas possuem como vantagem a convecção através dos poros, o que favorece uma adsorção em tempos menores. Uma análise mais detalhada do comportamento de adsorção nestes sistemas será abordado nos tópicos seguintes.

2.4.2 – Adsorção em géis de afinidade

A cromatografia de afinidade utilizando géis tradicionais tem sido bastante utilizada em escala industrial, para a purificação de vários produtos de interesse biotecnológico tais como: enzimas, proteínas do plasma, anticorpos monoclonais, vacinas e outros (Labrou e Clonis, 1994). Dentre as várias matrizes comercialmente disponíveis, a mais comumente utilizada para esta aplicação tem sido a agarose, um gel altamente hidrofílico que retém água na razão de 40 g H_2O/ g agarose seca, minimizando desta maneira possíveis interações não-específicas com a proteína (Kim *et al.*, 1991).

O desempenho de sistemas que empregam géis como matriz de afinidade, pode ser avaliado considerando-se os fenômenos de transferência de massa na partícula, os quais podem ser a difusão no interior dos poros, a transferência de massa no meio líquido ou a cinética de reação no interior do poro da partícula. No caso dos géis tradicionais, tem sido sugerido que a taxa de adsorção é controlada pela difusão da proteína, da superfície para o interior dos poros (Horstmann e Chase, 1989) e pode ser influenciada por fatores como o tamanho das partículas. O emprego de partículas pequenas favorece a taxa de adsorção, porém, em taxas de fluxo elevadas podem surgir problemas de compactação do leito (Anspach *et al.*, 1989, Unaska *et al.*, 1990, Charcosset *et al.*, 1995, Horstmann *et al.*, 1986). Em contraste, a utilização de partículas porosas grandes e rígidas minimizam os problemas de compressibilidade, porém, são limitadas por uma baixa difusão intrapartícula, exigindo longos tempos para as etapas de adsorção, lavagem e eluição, tornando o processo economicamente inviável (Charcosset *et al.*, 1995, Sridhar 1996).

Na maioria dos trabalhos publicados visando a remoção de auto-anticorpos por tratamento extracorpóreo, tem sido empregadas partículas porosas como matrizes para imobilização de ligantes (Tabela 2.1). Estudos comparando o desempenho destes vários sistemas no que tange a capacidade de remoção (adsorção) tem sido pouco conclusivos, uma vez que os autores não divulgam dados sobre a capacidade dinâmica do adsorvente, os quais deveriam ser obtidos durante a sessão de tratamento. Além disso, o tratamento extracorpóreo é, na maioria dos casos, realizado concomitantemente à administração de drogas imunossupressoras, dificultando esta avaliação. Outra dificuldade com a qual pesquisadores se defrontam é a omissão, por parte de alguns fabricantes de adsorventes

para aplicação em tratamento extracorpóreo, do método empregado para ativação do suporte, do tipo de braço espaçador ou da densidade de ligantes imobilizados na matriz, o que normalmente não ocorre com os adsorventes empregados para a purificação de IgG. Sabe-se que a matriz, o método de ativação e o braço empregado e a densidade de ligantes desempenham um papel importante na capacidade do adsorvente. Normalmente a capacidade de adsorção de IgG só é apresentada pelos fabricantes quando os adsorventes são empregados para sua purificação. Exemplos da capacidade de adsorção de IgG em proteína A e G imobilizada em função do método de ativação e do tipo de matriz são apresentados na Tabela 2.2. Observa-se que, para alguns adsorventes, é omitido o método de ativação e a densidade de ligantes. Ademais, a capacidade máxima de adsorção destas matrizes foi determinada, pelos fabricantes, em presença de tampão nas condições ótimas de pH e força iônica. Em tratamento extracorpóreo, a adsorção de IgG nas colunas é realizado diretamente a partir do plasma, sem a adição de soluções tamponantes, o que provavelmente diminuirá a capacidade de adsorção.

Quanto à constante de dissociação destes sistemas, os fabricantes não fornecem dados. Entretanto, autores como Horstman e Chase, 1989 que empregaram proteína A imobilizada em géis de agarose para a adsorção de IgG, obtiveram constantes da ordem de 10^{-7} M, indicando uma afinidade alta entre a proteína A e a IgG, característico de ligantes bioespecíficos.

Apesar da eficiência demonstrada pelos géis convencionais para a adsorção de IgG, membranas microporosas têm sido empregadas como matrizes alternativas para eliminar limitações como baixa difusão intrapartícula, ocasionada em partículas grandes de gel ou baixas taxas de fluxo, devido a altas quedas de pressão em partículas pequenas. Uma análise mais detalhada do desempenho em membranas de afinidade será realizada no tópico a seguir.

Tabela 2.2 Capacidade de adsorção de IgG humana em proteína A e G em função da matriz, método de ativação e densidade de ligantes

Ligante	Matriz	Método de Ativação	Densidade de Ligantes	Capacidade de Adsorção	Fonte
Proteína A	Partículas de acrílico	Oxirano	nd	10 mg/mL	Sigma
	Partículas de agarose ("crosslinked, 4%) "	p-nitrofenil cloroformato	nd	35-45 mg/ml	Sigma
	Partículas de agarose	nd	2 mg/ml	15 mg/ml	Biorad
	Partículas de agarose ("crosslinked, 4%)	brometo de cianogênio	2 mg/ml	20-30 mg/ml	Sigma
	Partículas de agarose ("crosslinked, 6%)	N-hidroxisuccinimida	3 mg/ml	20 mg/ml	Pharmacia
	Partículas de agarose ("highly crosslinked, 4%)	brometo de cianogênio	6 mg/ml	35 mg/ml	Pharmacia
	Polímero estável a altas pressões	nd	2 mg/ml	10-12 mg/ml	Biorad
	Partículas de agarose (macro, 6%)	brometo de cianogênio	6 mg/ml	6 mg/ml	Sigma

Continuação da Tabela 2.2 Capacidade de adsorção de IgG humana em proteína A e G em função da matriz, método de ativaçãc densidade de ligantes

Proteína A	Partículas rígidas de cerâmica	nd	nd	> 10 mg/ml	Sigma
	Partículas de agarose	Periodato	3 mg/mL	17 mg/mL	Hermanson *et al.*, 1995
			6 mg/mL	35 mg/mL	
	Partículas de agarose 6 B	nd	2,5 mg/g gel úmido	17	Teng *et al.*, 2000
	Partículas de agarose	nd	2 mg/mL	29 mg/mL	Horstman e Chase, 1989
			5,4 mg/mL	40 mg/mL	
Proteína G	Partículas de agarose ("highly crosslinked, 6%)	N-hidroxisuccinimida	2 mg/ml	> 25 mg/ml	Pharmacia
	Partículas de agarose	brometo de cianogênio	nd	20-30 mg/ml	Sigma
	Partículas de agarose	periodato	3 mg/mL	10 mg/mL	Hermanson *et al.*, 1995
			6 mg/mL	18 mg/mL	

nd = não duvulgado

2.4.3 – Adsorção em membranas de afinidade

Cromatografia em membranas de afinidade (MAC - "Membrane Affinity Chromatography") foi introduzida por Brandt e colaboradores em 1988, e esta técnica tem se mostrado muito promissora para a purificação de biomoléculas em larga escala. O princípio da separação empregando MAC consiste na adsorção da biomolécula de interesse no ligante, sendo este último imobilizado no interior dos poros da membrana. Assim, a solução contendo a biomolécula a separar é forçada a passar através da membrana. As moléculas grandes e partículas, que não atravessam os poros, são eliminadas na linha do retido, enquanto que as moléculas pequenas, inclusive a de interesse, atravessam os poros onde o ligante está imobilizado. A adsorção da biomolécula representa a primeira etapa da separação, na qual todas as moléculas não adsorvidas são eliminadas na linha do filtrado e do retido. A eluição representa a segunda etapa, onde a biomolécula é dessorvida do suporte sólido, podendo ser recuperada, se ela for o produto de interesse, ou descartada, se ela for uma impureza.

Nos sistemas que empregam membranas como suporte de afinidade, a transferência de massa, como nos géis, pode ser limitada pela difusão no interior dos poros, pela transferência de massa no meio líquido ou pela cinética de reação na superfície da partícula. Estes suportes possuem como vantagem principal, a rigidez da matriz e o fluxo convectivo do soluto para o interior dos poros, os quais minimizam as limitações difusionais e as quedas de pressão em vazões elevadas, ocasionadas em géis tradicionais (Kochan *et al.*, 1996, Sridhar, 1996). Consequentemente, a cinética de adsorção é limitada pela taxa de formação do complexo ligante-proteína, acarretando baixos tempos de residência para as etapas de adsorção, lavagem e eluição e altas taxas de separação de proteína por quantidade de ligante imobilizado (Charcosset *et al.*, 1995, Suen e Etzel, 1992). Apesar destas vantagens, alguns fatores podem afetar o desempenho das membranas de afinidade, como a difusão axial, a qual não é significativa em grandes colunas de partículas, pode ser relevante em membranas finas. Portanto, para evitar a difusão axial, é recomendado a utilização de membranas grossas e empilhadas (Suen e Etzel, 1992, Sridhar, 1996).

Além da espessura, a membrana adequada para aplicação em adsorção de proteínas, deve apresentar as seguintes características: alta hidrofilicidade, baixa adsorção não-

específica, poros grandes com distribuição uniforme, boa resistência mecânica e química, grupos reativos que permitam o acoplamento de ligantes e ser biocompatível (Klein, 1991, Charcosset, 1998).

A maioria dos polímeros utilizados na manufatura de membranas de microfiltração tais como nylon, poli(sulfona) ou poli(etileno) apresentam forte adsorção não-específica de proteínas na sua superfície, não sendo, portanto, adequados para utilização como suporte para imobilização de ligantes. Apesar deste inconveniente, membranas de nylon e de poli(sulfona) têm sido utilizadas em cromatografia de afinidade para purificação de proteínas devido à sua rigidez mecânica e homogenidade na distribuição de poros. Devido ao fato destes materiais serem pouco hidrofílicos, recomenda-se, antes de acoplar o ligante de afinidade, efetuar o recobrimento da matriz com materiais como hidroxietil celulose (HEC), álcool polivinílico (PVA), dextrana ou quitosana (Klein *et al.*, 1994B; Beeskow *et al.*, 1995, Klein *et al.*, 1997, Weissenborn *et al.*, 1997, Castilho *et al.*, 2000). O recobrimento da superfície com esses materiais permite a introdução, através de ligações covalentes, de grupamentos hidrofílicos na matriz, reduzindo a adsorção não-específica de proteínas e aumentando a densidade de grupos reativos para a imobilização do ligante (Klein *et al.*, 1994B; Beeskow *et al.*, 1995).

Diversos pesquisadores tem estudado a adsorção de IgG humana em membranas de afinidade (Tabela 2.3). Tem sido demonstrado que a capacidade máxima destes sistemas, pode variar com o método de ativação das matrizes. Como observado por Castilho *et al.*, 2000, as membranas de nylon modificadas com álcool polivinílico apresentaram uma maior constante de associação e menor adsorção não-específica do que as membranas modificadas com dextrana. Entre as membranas derivatizadas com proteína A, as fibras de poliétersulfona mostraram a maior capacidade para adsorção de IgG, entretanto a constante de associação foi da ordem de $10^3 M^{-1}$ (Klein *et al.*, 1994B), resultado não significante para membranas de afinidade, já que estes valores devem ser acima de 10^5 para a adsorção ser considerada eficiente (Castilho *et al.*, 2000). Os valores de capacidade máxima e constante de dissociação obtidos com membranas de PEVA contendo histidina imobilizada são comparáveis aos obtidos por sistemas que empregam a proteína A como ligante, apresentando, portanto, potencialidade para ser empregado como um sistema alternativo em tratamentos extracorpóreos.

Poucos trabalhos tem sido relatados sobre a comparação de sistemas empregando membranas ou géis como matrizes de afinidade para adsorção de proteínas. Especificamente para a adsorção de IgG humana, Unarska *et al.*, 1990, compararam o desempenho dos sistemas proteína A-membranas de nylon e proteína A-gel de agarose, analisando o efeito do fluxo através das membranas. Os resultados mostraram que na ausência de fluxo (experimentos realizados em modo estático) a constante da taxa de associação da proteína é comparável para os dois sistemas. Na presença de fluxo, apesar das membranas terem demostrado uma maior taxa de associação, foi obtida uma capacidade de adsorção quatro vezes menor que para o gel. Unarska e colaboradores, 1990 sugeriram que estes resultados podem ter sido influenciados pelas diferenças nas concentrações iniciais de proteína, impedindo assim uma comparação mais adequada entre os dois sistemas.

Dessa forma, a escolha do adsorvente mais adequado exige a determinação de parâmetros como a capacidade máxima de adsorção, a constante de dissociação entre a proteína e o ligante e as constantes cinéticas de adsorção e dessorção, levando em consideração fatores como, a natureza das matrizes, a densidade de ligantes, o método de ativação e imobilização de ligantes e condições operacionais que servirão como base para uma possível comparação entre os sistemas.

Tabela 2.3: Capacidade máxima e constante de dissociação de vários sistemas de afinidade que empregam membranas como matriz para a imobilização do ligante para adsorção de IgG humana

Ligantes	Matriz	Recobrimento	Agente de ativação	Capacidade do suporte	Constante de dissociação	Fonte
Proteína A	Membranas de fibra oca de polietersulfona	Hidroxietilcelulose	2-fluor 1-metilpiridina tolueno-4-sulfonato (FMP)	8,8 mg/mL	$2,1 \times 10^{-8}$ M	Charcosset *et al.*, 1995
				9,2 mg/mL	8×10^{-8} M	
	Membranas de nylon na forma de discos	Dextrana	Formaldeído	13,28 mg de IgG/mL	$1,5 \times 10^{-6}$ M	Castilho *et al.*, 2000
	Membranas de nylon na forma de discos	PVA	Bisoxirano	7,02 mg de IgG/mL	$1,1 \times 10^{-6}$ M	Castilho *et al.*, 2000
	Membranas de nylon na forma de discos	Dextrana	Bisoxirano	12,42 mg de IgG/ mL	$4,6 \times 10^{-6}$ M	Castilho *et al.*, 2000
Proteína A recombinante	Fibras ocas de poliétersulfona	Quitosana	Etileno glicol diglicidil éter	41 mg/mL	nd	Klein *et al.*, 1994B
				27,5 mg/mL	nd	
	Membrana plana de celulose	----	Glutaraldeído	23,8 mg/g seca	nd	Jia *et al.*, 1999
Histidina	Membrana de fibra oca de álcool polietileno vonílico	-----	Bisoxirano	86 mg/ml	$3,7 \times 10^{-6}$ M	Bueno *et al.*, 1996
				78 mg/g seca	$9,8 \times 10^{-6}$ M	

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste item são apresentados materiais, equipamentos e procedimentos utilizados para a realização dos experimentos.

3.1- Materiais

γ-Globulina (IgG humana pré-purificada, pureza de aproximadamente 99%, preparada a partir da fração cohn), 1,4 butanodiol diglicidil éter, L-histidina, borohidreto de sódio, ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) e ácido hidroxietilpiperazinaetanosulfônico (Hepes) foram obtidos da Sigma (EUA); utilizou-se também γ-Globulina (IgG humana pré-purificada, pureza de aproximadamente 95%) obtida da Centeon Pharma (Alemanha). Sangue sadio foi doado por Luciana Cristina Lins de Aquino (idade 25 anos). Sulfato de cobre e cloreto de sódio foram adquiridos da Merck (Alemanha). Acetato de sódio foi obtido da Reagen (Brasil). Hidróxido de sódio, ácido acético glacial e carbonato de sódio foram obtidos da LabSynth (Brasil). Ácido clorídrico, Tris (hidroximetil aminometano) e glicerol foram obtidos da Pharmacia (EUA). Glutaraldeído foi obtido da Casa da Química (Brasil) e álcool etílico da Cromato Produtos Químicos (Brasil). Tiras de tampão de SDS ("buffer strip"), gel de eletroforese de acrilamida (gradiente de concentração 4 a 15%) e marcadores de alta massa molecular foram obtidos da Pharmacia (EUA); nitrato de prata, Ecibra (Brasil). As soluções foram preparadas com água ultrapura obtida do equipamento Millipore milli Q (Millipore, EUA).

Para os experimentos de adsorção de IgG humana e soro humano com o ligante histidina imobilizado, foram utilizados os seguintes suportes: membranas de fibras ocas de álcool poli etileno vinílico (PEVA) (Modelo Eval 4A), obtidas da Kuraya Co. (Osaka,

Japão) e gel Toyopearl HW-65F, um copolímero de metacrilato obtido da Sigma (EUA). As especificações destas matrizes estão apresentadas na Tabela 3.1.

Para os experimentos cromatográficos foi utilizada uma coluna da Biosepra com 130 mm de comprimento, 14,1 mm de diâmetro externo e 12,4 mm de diâmetro interno e nos experimentos para a determinação de isotermas de adsorção e parâmetros cinéticos foram utilizadas seringas de 3 mL da marca Bakerbond (EUA).

Tabela 3.1 : Especificações dos suportes utilizados (Fonte: Kuraray Co, Japão e Tosohaas, Japão)

	Toyopearl HW-65F	Fibra oca de álcool polietileno vinílico (PEVA)
Tamanho da partícula	30 a 60 μm	-
Diâmetro de poro	1000 Å	0,05 μm
Diâmetro interno	-	200 μm
Diâmetro externo	-	240 μm
Tamanho nominal de corte	-	600 kDa
Faixa de fracionamento de proteínas globulares	40 a 5000 kDa	-
Área superficial	105 m^2/g gel seco	49,5 m^2/g membrana seca
Massa úmida/mL	1g	2g
Massa seca /mL	313 mg	191mg
Massa seca para 50 mg de massa úmida*	10,0 mg	14,5 mg
Razão massa úmida/massa seca	5,0	3,4

*Secagem em estufa.

Estrutura Química das matrizes

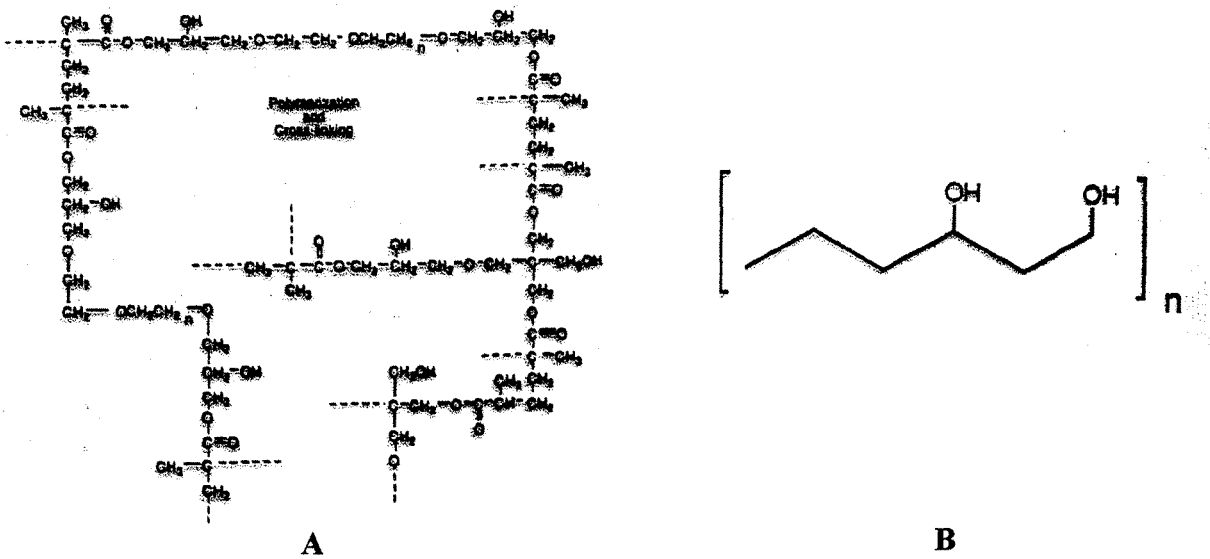


Figura 3.1 – A: Estrutura química do gel Toyopearl HW (Hermanson *et al.*, 1992) e B: Estrutura química da membrana de álcool polietileno vinílico (PEVA)

3.2 – Métodos

3.2.1-. Ativação das matrizes com 1,4 butanodiol diglicidil éter

Ativação das membranas de PEVA

As fibras ocas de PEVA foram removidas do cartucho comercial de 1 m^2 de área e finamente cortadas (em tamanho de aproximadamente 3 mm). Em seguida, as membranas embebidas em água foram desgaseificadas para remover o ar presente nos poros, utilizando uma bomba de vácuo e sem filtrá-las, retirou-se toda a água, lavando três vezes com uma solução de NaOH 0,6 M.

Em capela, foi montado o experimento para a ativação onde um frasco Erlenmeyer de 200 ml contendo as fibras foi colocado em um agitador magnético Hitrel HTR 8068, marca IKA (Alemanha). Foi adicionado às fibras 50 ml de bisoxirano, 40 ml de NaOH 0,6 M e 0,2085 g de $NaBH_4$ dissolvido em 10 ml de NaOH 0,6 M e a reação foi realizada sob agitação, a temperatura ambiente durante 8 horas, conforme descrito em Bueno *et al.*, 1995A.

Após o término da reação, as fibras foram lavadas com água destilada até que não foi visualizado gotas de óleo na solução, indicando que todo o reagente bisoxirano colocado em excesso foi removido.

Ativação do gel Toyopearl

Primeiramente o gel foi lavado com água destilada e decantado por várias vezes para remover as partículas mais finas; em seguida foi filtrado a vácuo utilizando como filtro um vidro sinterizado.

O processo de ativação do gel foi similar ao descrito para as membranas de PEVA. Devido a uma maior quantidade de gel (cerca de 70 ml) foram adicionados 100 ml de bisoxirano, 90 ml de NaOH 0,6 M e 0,3800 g de borohidreto de sódio dissolvido em 10 ml de NaOH 0,6 M. O frasco contendo a solução foi então colocado em um agitador orbital modelo 255-B (FANEM, Brasil), a temperatura ambiente durante 8 horas. Finalizada a reação, lavou-se o gel várias vezes com água ultra pura para remover o excesso de bisoxirano até obter a igualdade entre o pH da água de lavagem (descarte) e o pH da água ultra pura.

3.2.2 – Imobilização de L-histidina nas matrizes ativadas

As membranas e o gel, previamente ativados com bisoxirano, foram inicialmente lavados com solução de carbonato de sódio 1,5 M. Em seguida, os suportes foram colocados em um erlenmeyer e adicionou-se uma solução de histidina a 20% (pH 11), deixando sob agitação, em um agitador orbital (Nova Técnica, Brasil) a 60°C durante 24

horas. Após a reação, os suportes foram lavados com água ultrapura até verificar uma igualdade no pH da solução e da água, indicando que foi retirada toda a histidina não imobilizada. Os sistemas assim obtidos, foram denominados His-PEVA e His-Toyopearl, cuja estrutura proposta está representada na Figura 3.2.

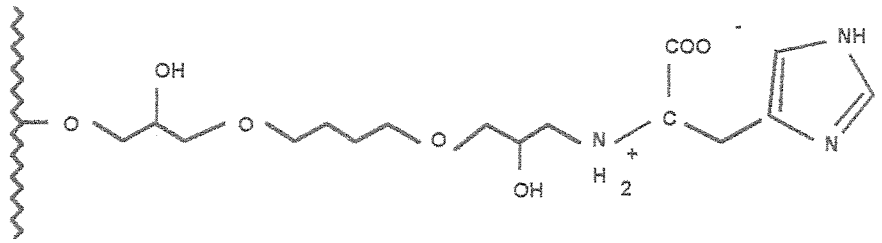


Figura 3.2: Estrutura proposta da matriz de pseudobioafinidade (Haupt *et al.*,1995)

3.2.3 – Determinação da densidade de ligantes imobilizados nos suportes His-PEVA e His-Toyopearl

O experimento consistiu em alimentar uma coluna cromatográfica contendo 1mL de adsorvente, com 50 mL de uma solução de sulfato de cobre 50 mM, a uma vazão de 1mL/min, até visualizar que o adsorvente estava completamente azul. Em seguida, para remover o cobre em excesso, lavou-se exaustivamente a coluna com água ultra pura até obter absorbância zero a 809 nm (comprimento de onda de máxima absorção do cobre). Após a lavagem, o cobre que permaneceu ligado aos suportes, foi removido com uma solução de EDTA 200 mM pH 7,0 e coletado em frações de 3 mL para determinar a absorbância a 730 nm (comprimento de onda, no qual o complexo cobre-EDTA apresenta a maior absorção). Por fim, os suportes foram lavados com água ultrapura para remover a solução de EDTA. Este procedimento foi realizado em duplicata para os suportes His-PEVA e His-Toyopearl.

A concentração de cobre nos suportes foi determinada utilizando medida de absorbância das frações coletadas e um coeficiente de extinção, obtido a partir da curva de calibração do cobre em 200 mM de EDTA pH 7,0.

3.2.4 – Determinação de proteína total

A proteína total presente nas amostras foi quantificada através do microensaio apresentado por Bradford, 1976, utilizando albumina do soro bovino como proteína de referência.

3.2.5 – Eletroforese SDS-PAGE das proteínas adsorvidas e não adsorvidas nos suportes derivatizados e não derivatizados

A eletroforese SDS-PAGE realizada no equipamento Mini Protein II cell e Power Pac 300 Power Supply (Bio Rad, EUA), sob condições desnaturantes e redutoras, consistiu na preparação de um gel de poliacrilamida 10%, seguido pela desnaturação das amostras com dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, β-mercaptoetanol e aquecimento a 100 °C por 8 minutos. A separação das proteínas no gel foi obtida em cuba vertical com voltagem constante de 200 V. Em seguida as proteínas foram visualizadas por coloração do gel com nitrato de prata, segundo o protocolo descrito por Morryssey, 1981.

A eletroforese SDS-PAGE realizada no equipamento Phast-System (Pharmacia, EUA), sob condições desnaturantes e não redutoras, consistiu na preparação das amostras adicionando-se apenas dodecil sulfato de sódio 10%, seguido pelo aquecimento a 100 °C por 8 minutos. O procedimento utilizando gel de poliacrilamida com gradiente 4-15% e a coloração do gel com nitrato de prata, foram realizados como descrito no manual do equipamento.

3.2.6 - Cromatografia em colunas com gel His-Toyopearl ou membranas His-PEVA finamente cortadas

Foram realizados experimentos cromatográficos para verificar se a IgG seria adsorvida nos suportes derivatizados. Uma coluna foi empacotada com 3 mL de leito de fibras de His-PEVA, finamente cortadas (0,66 g de membrana seca) ou gel His-Toyopearl

(0,94 g de gel seco). O adsorvente foi equilibrado com tampão Hepes 25 mM pH 7,0 a uma vazão de 0,7 mL/min durante 45 minutos, utilizando uma bomba peristáltica (Bio Rad, EUA).

Uma solução contendo 2 mg de IgG humana pré-purificada em 6 mL de tampão Hepes 25 mM pH 7,0 foi injetada na coluna a uma vazão de 0,4 mL/min. Posteriormente a coluna foi lavada, com o mesmo tampão de equilíbrio, para eliminar a proteína não adsorvida e a IgG foi dessorvida através de uma eluição com tampão acetato de sódio a 25 mM contendo 1 M de NaCl a pH 4,0. Por fim o suporte foi regenerado com uma solução de NaOH 25 mM, seguido pela lavagem com água ultrapura. A corrente de saída da coluna foi conectada a um monitor de medida de absorbância Econo UV (Bio Rad, EUA), cujos sinais eram emitidos continuamente a um registrador modelo 1327 (Bio-Rad, EUA), que traçava um cromatograma referente aos dados obtidos. Foram coletadas frações de saída de 2,4 mL em um coletor de frações modelo Advantec SF-2120 (Japão) e a absorbância foi medida a 280 nm em um espectrofotômetro U2000 (Hitachi, Japão) para a determinação das massas, utilizando um coeficiente de extinção igual a 1,17 para IgG ($mL.mg^{-1}$).

Um esquema da montagem experimental está mostrado na Figura 3.3.

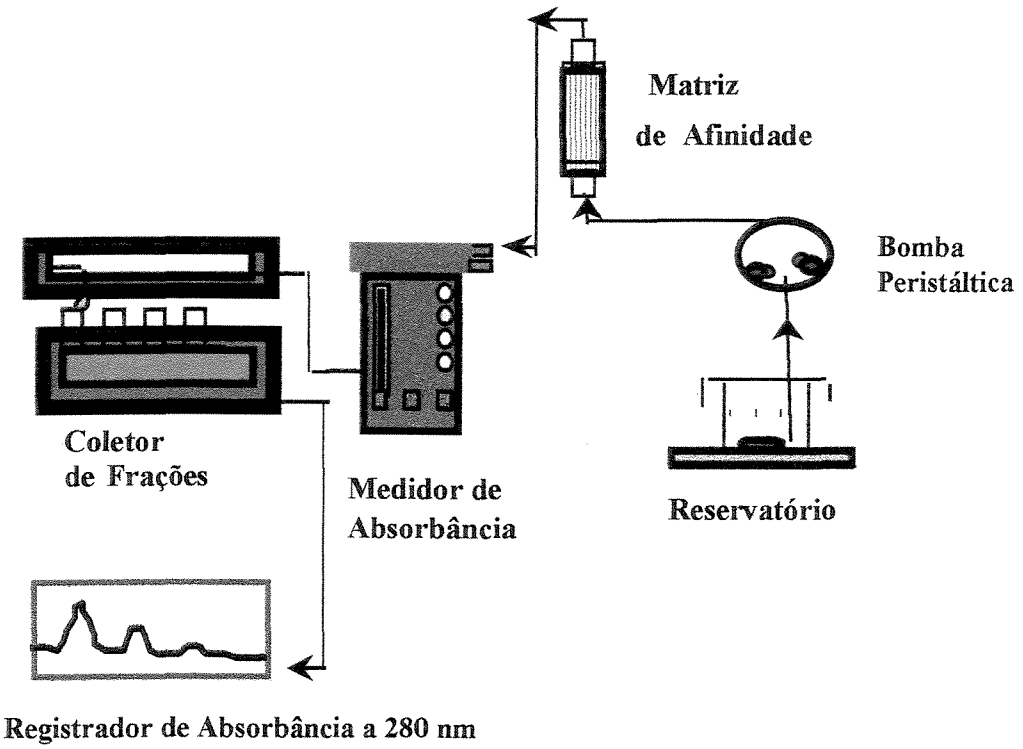


Figura 3.3.- Adsorção de IgG humana em membranas His-PEVA e gel His-Toyopearl

3.2.7 – Experimentos para a determinação da seletividade

A seletividade dos sistemas His-PEVA e His-Toyopearl foi testada, através de cormatografias como descrito no item 3.2.6, em tampão Hepes pH 7,0 e para o gel Toyopearl não derivatizado e derivatizado com o ligante histidina, em tampão Tris-HCl pH 7,4. Uma coluna da Biosepra foi empacotada com 8 mL de gel e 5 mL de membranas finamente cortadas. A fase móvel foi alimentada na coluna através de uma bomba peristáltica a vazão de 0,4 mL/min. Inicialmente o sistema foi equilibrado com o tampão de adsorção. Após esta etapa de equilíbrio, 2 mL de soro humano diluídos neste tampão foram injetados na coluna. Após a injeção do soro, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de equilíbrio, para eliminar as proteínas não adsorvidas pelo sistema, em seguida, as proteínas adsorvidas

foram eluídas com o mesmo tampão contendo 0,4 M de NaCl e, por fim, os suportes foram regenerados com uma solução de NaOH 25 mM e água ultrapura.

Durante a cromatografia foram coletadas amostras das frações de adsorção e eluição. Estas foram agrupadas e analisadas quanto ao teor de proteínas e sua pureza, através de uma eletroforese SDS-PAGE, no equipamento Phast-System (Pharmacia, EUA), utilizando um gel de acrilamida com gradiente de 4 a 15%. Após a eletroforese, a coloração do gel foi feita com nitrato de prata segundo procedimento descrito no manual do equipamento.

3.2.8 - Determinação da capacidade de adsorção em modo frontal para os sistemas His-PEVA e His-Toyopearl

Foi verificada a capacidade de adsorção dos sistemas His-PEVA e His-Toyopearl na presença do tampão Hepes 25mM pH 7,0 e Tris-HCl 25 mM pH 7,4. Para estes experimentos foi utilizado o mesmo esquema experimental mostrado na Figura 3.3. Inicialmente uma coluna contendo 1mL de gel His-Toyopearl ou membranas His-PEVA finamente cortadas foi equilibrada com tampão de adsorção e, em seguida, injetou-se uma solução de IgG humana pré-purificada (Centeon Pharma) com concentração de 20 mg/mL. A saturação da coluna com IgG foi observada através do registrador Flatbed Recorder Mode BD111 (Kipp&Zonen, Holanda) até quando um platô foi atingido na curva de ruptura durante a adsorção. A partir deste ponto, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de equilíbrio para remover a proteína não adsorvida e a eluição, com tampão acetato de sódio 25 mM pH 4,0 contendo 1 M de NaCl, removeu a proteína adsorvida pelo sistema. Por fim, os suportes foram regenerados com NaOH 25 mM e água ultrapura. Amostras das etapas de adsorção e eluição foram coletadas em frações individuais de 2,4 mL e a absorbância foi medida a 280 nm em espectrofotômetro U2000 (Hitachi, Japão) para determinar a quantidade de proteína adsorvida em cada sistema. As frações das etapas de lavagem e eluição dos sistemas His-PEVA e His-Toyopearl foram analisadas através de uma eletroforese SDS-PAGE, no equipamento da Bio Rad.

3.2.9 - Análise de equilíbrio de adsorção em tanques agitados

Os experimentos para obtenção de isotermas de adsorção foram realizados em tanques agitados, utilizando seringas de 3 mL, segundo o esquema mostrado na Figura 3.4. As isotermas de adsorção foram determinadas à temperatura ambiente e a 37 °C, para as membranas de PEVA e para o gel Toyopearl, na presença e ausência do ligante histidina, utilizando o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4, como tampão de adsorção.

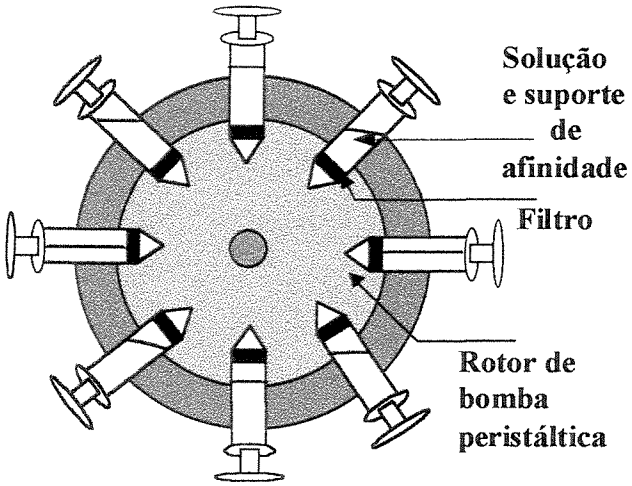


Figura 3.4: Esquema experimental para a obtenção de isotermas de adsorção(Figura adaptada de Lucena, 1999)

O procedimento experimental consistiu em equilibrar 50 mg (massa úmida) do adsorvente contido nas seringas, com tampão de adsorção durante 3 a 4 horas. Em seguida, este tampão foi descartado e adicionou-se 1ml de várias soluções de IgG humana pré-purificada (Sigma, EUA) de diferentes concentrações sendo a máxima variando de 15 a 16 mg/mL. As seringas foram deixadas sob agitação de 5 a 6 rpm durante 2 a 3 horas, tempo suficiente para o equilíbrio ser atingido, tendo sido verificado anteriormente que o equilíbrio

era atingido para ambos adsorventes nos primeiros minutos da adsorção . Após atingido o equilíbrio, a densidade ótica do sobrenadante foi medida a 280 nm no espectrofotômetro U2000 (Hitachi, Japão) para determinar a concentração de proteína não adsorvida (C_{eq}) pelo suporte. A quantidade de proteína adsorvida por grama de adsorvente (Q) foi calculada usando a Equação 2.7. Os dados experimentais obtidos para C_{eq} e os valores calculados de Q foram utilizados para ajustar os parâmetros do modelo de Langmuir (equação 2.4) ou do modelo linear (equação 2.5).

Visando a aplicação em tratamentos extracorpóreos, foram determinadas isotermas de adsorção a 37°C, temperatura do corpo humano, para as membranas de PEVA e para o gel Toyopearl na presença e ausência do ligante histidina.O procedimento experimental empregado foi o mesmo para temperatura ambiente, com a diferença que as seringas foram agitadas em estufa, com a temperatura controlada entre 36 e 38 °C.

Os experimentos para a determinação das isotermas de adsorção foram realizados em duplicata para cada suporte estudado.

3.2.10 – Análise de equilíbrio de adsorção considerando as etapas de eluição e regeneração dos suportes

Nestes experimentos, as seringas contendo 50 mg de adsorvente foram equilibradas com tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4, e em seguida, adicionou-se 1 mL de solução de IgG humana pré-purificada (Sigma, EUA), nas concentrações de 2 e 16 mg/mL, preparadas a partir de uma solução de IgG de 19 mg/mL em tampão Tris-HCl pH 7,4. As seringas foram agitadas por uma hora, segundo o esquema da Figura 3.4, e após ser atingido o equilíbrio, o sobrenadante foi removido para efetuar a lavagem, eluição e regeneração dos suportes. A etapa de lavagem, para remover a quantidade de proteína não adsorvida, foi realizada com o tampão de equilíbrio. A quantidade de proteína adsorvida pelos suportes foi obtida das etapas de eluição com o tampão acetato de sódio 25 mM pH 4,0 contendo 1 M de NaCl e regeneração com uma solução de hidróxido de sódio 25 mM. Cada etapa somente foi finalizada após ser obtido absorbância zero a 280 nm nas frações coletadas. Os experimentos

foram realizados a temperatura ambiente, em triplicata, para as membranas de PEVA e gel Toyopearl com e sem histidina imobilizada.

3.2.11 – Cinética de adsorção dos suportes His-PEVA e His-Toyopearl

Os experimentos para a determinação da cinética de adsorção dos sistemas His-PEVA e His-Toyopearl foram realizados em duplicata em tanques agitados, utilizando seringas contendo 50 mg de adsorvente (massa úmida). Foram preparadas soluções de IgG humana pré-purificada (Centeon) em tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4, nas concentrações de 0,25, 3 e 9 mg/mL. Para cada concentração de IgG, 1 mL de solução foi injetada nas seringas, e sob agitação o sobrenadante foi removido nos tempos 6, 10, 20, 30 segundos, 1, 3, 5, 10, 20 e 30 minutos. A concentração de IgG não adsorvida pelos suportes foi determinada para os tempos indicados, medindo-se a densidade ótica a 280 nm de cada sobrenadante recolhido. A partir destes valores foram construídas curvas cinéticas indicando o perfil da adsorção de proteína com o tempo. As constantes de adsorção e dessorção foram determinadas para os sistemas His-PEVA e His-Toyopearl, através de um programa computacional, utilizando a equação 2.8 (modelo simplificado de Skidmore *et al.*, 1990). Obtidas as constantes cinéticas, foram construídas curvas teóricas utilizando a equação 2.9 (solução analítica da equação 2.8), para verificar se o modelo foi ajustado aos dados experimentais.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Ativação dos suportes e imobilização de histidina

As membranas de PEVA e o gel de metacrilato Toyopearl apresentam na sua estrutura grupamentos hidroxilas permitindo a ativação por reagentes que apresentam grupamentos epóxido, como o 1,4 butanodiol diglicidil éter (bisoxirano). O bisoxirano é um reagente bifuncional, sendo que a imobilização de histidina no suporte ocorreu entre o grupamento epóxido e o grupo α-amino do aminoácido, formando uma ligação éter bastante estável (Sundberg e Poraty, 1974). Após este processo, os suportes foram denominados His-PEVA e His-Toyopearl.

A densidade de ligantes nos suportes His-PEVA e His-Toyopearl foi medida através da formação de ligação de coordenação entre o cobre e o ligante histidina imobilizado. Os adsorventes derivatizados, empacotados em colunas cromatográficas, foram saturados com uma solução de solução de sulfato de cobre a 50 mM. A imobilização de histidina foi inicialmente verificada através da observação visual de uma coloração azul nos suportes, que persistiu após exaustiva lavagens das colunas com água ultrapura.

O cobre ligado aos adsorventes foi eluído com uma solução de EDTA 200mM a pH 7,0 e as frações obtidas foram analisadas a 730 nm utilizando uma curva de calibração previamente construída. Assumindo que o cobre se liga a histidina na proporção 1:1, a densidade de ligantes foi estimada pela soma da quantidade de cobre obtida nas frações de eluição, resultando em 44 μmol/mL (140,6 μmol/g suporte seco) e 20 μmol/mL (22,7 μmol/ g suporte seco) para His-Toyopearl e His-PEVA, respectivamente.

Os resultados indicam uma densidade de ligantes (μmol/g suporte seco) seis vezes maior para o gel do que para a membrana, provavelmente devido ao fato do gel apresentar uma área superficial duas vezes maior (105 m^2/g gel seco) que a da membrana de PEVA

(49,5 m^2/g membrana seca). Outras hipóteses para explicar esse fenômeno seriam que a ativação do gel foi mais eficiente ou que o mesmo possui uma maior quantidade de grupamentos hidroxilas que possam ser ativáveis.

A ordem de grandeza da densidade de histidina imobilizada em His-PEVA determinada neste trabalho está coerente com dados publicados por Bueno, 1995, que pelo método de análise elementar de nitrogênio, obteve 60 μmol/g de membrana seca para a membrana de PEVA com tamanho nominal de corte de 400 kDa.

Experimentos de controle realizados com os suportes não derivatizados confirmaram que o cobre não forma ligações de coordenação com os mesmos, mostrando que não há interações não-específicas entre o cobre e a matriz.

4.2- Adsorção de IgG nos suportes de afinidade utilizando Hepes como tampão de adsorção

4.2.1. Ensaios preliminares

O objetivo desses ensaios foi de verificar se IgG seria adsorvida no sistema His-Toyopearl e comparar a quantidade de proteína adsorvida com aquela obtida com o sistema His-PEVA. Segundo Haupt, 1994 e Haupt *et al.*, 1995, os tampões que propiciam maior capacidade de adsorção em sistemas com histidina imobilizada são Hepes pH 7,0 e Mops pH 6,5. Como o tampão Hepes propicia uma adsorção de IgG a pH 7,0 próximo ao do plasma humano (pH 7,4), optou-se por realizar os experimentos cromatográficos com este sistema tamponante.

As Figuras 4.1 e 4.2 ilustram os cromatogramas típicos dos experimentos realizados com as membranas His-PEVA finamente cortadas e o gel His-Toyopearl, respectivamente, onde foi injetado 1 ml de IgG pré-purificada a uma concentração de 2 mg/mL.

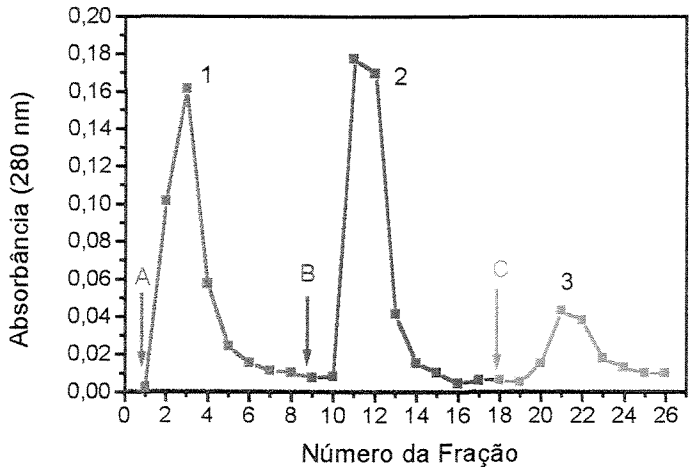


Figura 4.1 : Cromatografia de IgG pré-purificada em coluna contendo membranas His-PEVA. Injeção de 2 mg de IgG humana. Tampão de lavagem, Hepes 25 mM pH 7,0 (■); tampão de dessorção, acetato de sódio 25 mM pH 4,0 com NaCl 1 M (■), solução de regeneração, hidróxido de sódio 25 mM (■); vazão 0,4 mL/min;volume das frações, 2,4 mL. As setas indicam início das etapas de lavagem (A), dessorção (B) e regeneração (C). Os números de 1 a 3 indicam os picos de proteína obtidos.

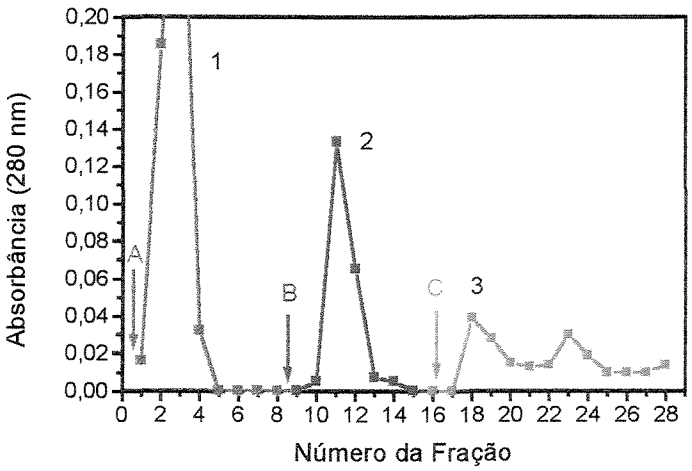


Figura 4.2 : Cromatografia de IgG pré- purificada em coluna contendo gel His-Toyopearl. Injeção de 2 mg de IgG humana. Tampão de lavagem, Hepes 25 mM pH 7,0 (■); tampão de dessorção, acetato de sódio 25 mM pH 4,0 com NaCl 1 M (■), solução de regeneração, hidróxido de sódio 25 mM (■); vazão 0,4 mL/min; volume das frações, 2,4 mL. As setas indicam início das etapas de lavagem (A), dessorção (B) e regeneração (C). Os números de 1 a 3 indicam os picos de proteína obtidos.

Nos cromatogramas, o primeiro grande pico representa as proteínas não retidas nos suportes de afinidade e o segundo pico, as proteínas adsorvidas e eluídas com o tampão de dessorção. A adição de tampão acetato de sódio pH 4,0 com NaCl 1 M não foi suficiente para eluir todas as proteínas adsorvidas nos suportes de afinidade. As proteínas fortemente adsorvidas foram, então, removidas com a solução de hidróxido de sódio 25 mM na etapa de regeneração.

Os cromatogramas típicos apresentados nas Figuras 4.1 e 4.2 demonstram que a adsorção de IgG foi possível em ambos os suportes. As quantidades e as porcentagens de IgG obtidas em cada pico, para cada adsorvente, são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Balanço de massa das cromatografias com IgG pré-purificada em His-PEVA e gel His-Toyopearl.

	Recuperação de IgG			
	His-PEVA*		His-Toyopearl**	
	Massa (mg)	Porcentagem	Massa (mg)	Porcentagem
Alimentação	2,00	100	2,00	100
Lavagem	0,79	39,5	1,14	57,0
Eluição	0,89	44,5	0,44	22,0
Regeneração	0,29	14,5	0,37	18,5
Total* **	1,97	98,5	1,95	97,5

*** massa seca de membrana = 0,66 g ** massa seca de gel = 0,939 g**

***** somatório das massas de IgG obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração**

Uma análise preliminar permite verificar que o sistema His-PEVA adsorveu uma quantidade maior de proteína do que o sistema His-Toyopearl, 1,78 mg/g membrana seca (1,55 mg/mL) e 0,86 mg/g gel seco (0,27 mg/mL), respectivamente. Como a quantidade de IgG injetada nas cromatografias não foi saturante, fez-se necessário confirmar esses resultados através da injeção de uma solução de IgG com alta concentração até a saturação do leito cromatográfico.

4.2.2 – Determinação da capacidade de adsorção dos suportes em modo frontal

A capacidade de adsorção dos suportes His-PEVA e His-Toyopearl foi determinada em colunas, saturando os adsorventes com uma solução de IgG pré-purificada em tampão Hepes pH 7,0 a 20 mg/mL. Nos cromatogramas típicos das Figuras 4.3 e 4.4, estão mostrados o pico de lavagem com tampão Hepes pH 7,0 (pico1), correspondente à proteína não adsorvida pelos sistemas, o pico de eluição com acetato pH 4,0 com NaCl 1 M (pico2), correspondente à proteína adsorvida e o pico da regeneração do adsorvente com uma solução de NaOH 25 mM (pico3). A Tabela 4.2 apresenta as massas de IgG obtidas nas etapas de eluição e regeneração e a capacidade de adsorção em mg de proteína por g suporte seco.

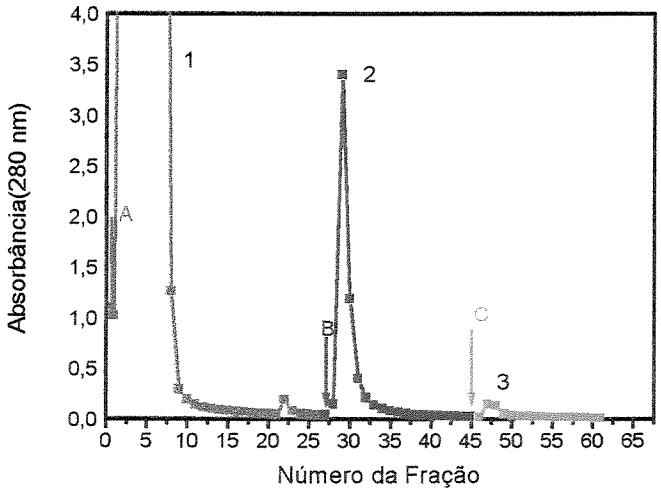


Figura 4.3: Cromatografia de IgG pré-purificada saturando a coluna contendo membrana His-PEVA. Injeção de 13 mL de IgG humana a 20 mg/mL. Tampão de lavagem, Hepes 25 mM pH 7,0 (●); tampão de dessorção, acetato de sódio 25 mM pH 4,0 com NaCl 1 M (■), solução de regeneração, hidróxido de sódio 25 mM (▲); vazão 0,4 mL/min; volume das frações, 2,4 mL. As setas indicam início das etapas de lavagem (A), dessorção (B) e regeneração (C). Os números de 1 a 3 indicam os picos de proteína obtidos.

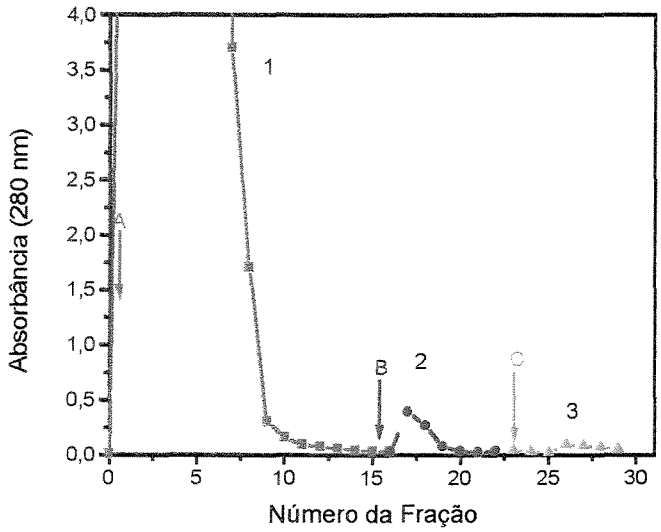


Figura 4.4: Cromatografia de IgG pré-purificada saturando a coluna contendo gel His-Toyopeal. Injeção de 13 mL de IgG humana a 20 mg/mL. Tampão de lavagem, Hepes 25 mM pH 7,0 (■); tampão de dessorção, acetato de sódio 25 mM pH 4,0 com NaCl 1 M (●), solução de regeneração, hidróxido de sódio 25 mM (▲); vazão 0,4 mL/min; volume das frações, 2,4 mL. As setas indicam início das etapas de lavagem (A), dessorção (B) e regeneração (C). Os números de 1 a 3 indicam os picos de proteína obtidos.

Tabela 4.2: Capacidade de adsorção dos suportes His-Toyopearl e His-PEVA obtidas através dos experimentos realizados em modo frontal com tampão de adsorção Hepes pH 7,0.

	Massa de IgG na eluição (mg)	Massa de IgG na regeneração (mg)	IgG adsorvida *(mg)	IgG adsorvida (mg/g suporte seco)
His-Toyopearl	1,4	0,6	2,0	6,4
His-PEVA	10,1	0,8	10,9	50

***somatório das massas de proteína obtidas nas etapas de eluição e regeneração**

Através dos cromatogramas, visualiza-se um maior pico de eluição para o suporte His-PEVA do que para o His-Toyopearl. Este resultado foi confirmado através dos cálculos da massa de proteína eluída, mostrados na Tabela 4.2, onde foi verificado que a adsorção de IgG na membrana foi 5,5 vezes maior que no gel. Como consequência, a capacidade de

adsorção (mg/g suporte seco) para o sistema His-PEVA foi 8 vezes maior que para o sistema His-Toyopearl.

Tendo em vista que a IgG utilizada nas cromatografias continha aproximadamente 1 % de contaminantes (dado fornecido pelo fabricante), foi verificado se estes seriam adsorvidos nos suportes. Assim, as frações agrupadas dos picos de lavagem e eluição, obtidos através das cromatografias, foram submetidas à análise de eletroforese SDS-PAGE.

4.2.3.- Seletividade dos suportes de afinidade em presença de tampão Hepes

As frações de lavagem e eluição obtidas durante as cromatografias descritas no item 4.2.2 foram agrupadas e analisadas através de eletroforese SDS-PAGE, como mostrado na Figura 4.5. Os géis **a** e **b** correspondem, respectivamente, a cromatografia nos suportes His-Toyopearl e His-PEVA. A faixa 1 indica os marcadores de massa molecular, na faixa 2 está representada a proteína não adsorvida pelos suportes, obtida na etapa de lavagem a pH 7,0, a faixa 3 indica a proteína adsorvida, obtida na etapa de eluição à pH 4,0 e a faixa 4 corresponde à IgG humana pré-purificada. Comparando a faixa 3 dos géis de eletroforese, observa-se que o sistema His-Toyopearl adsorveu além da IgG, uma maior quantidade de outros componentes visualizados por um maior número de bandas, demonstrando este sistema uma menor seletividade em relação ao suporte His-PEVA.

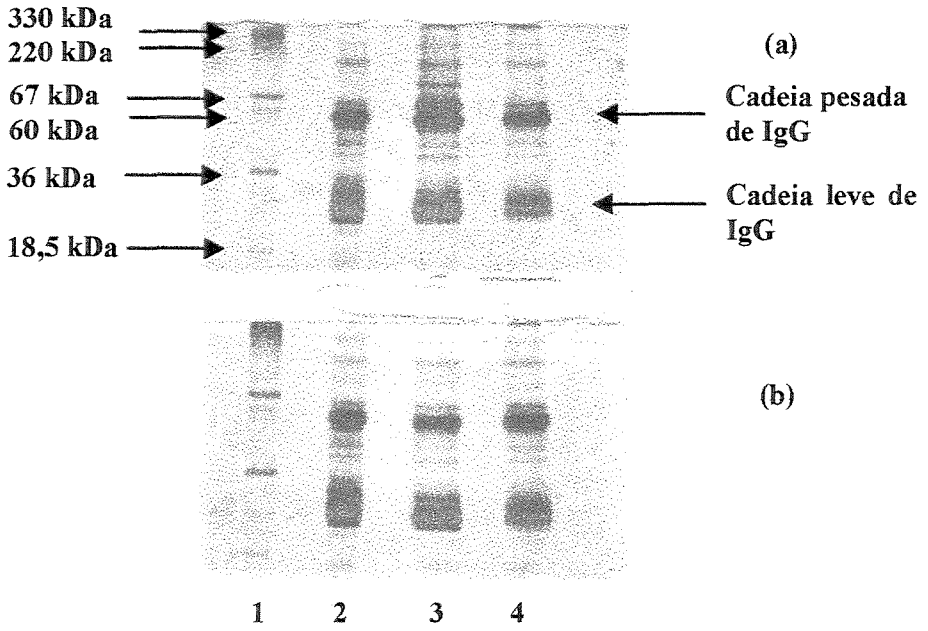


Figura 4.5 : Eletroforese-SDS-PAGE em gel de acrilamida 10%. Revelação com nitrato de prata. Amostras sob condições desnaturantes e redutoras obtidas a partir: (a) da cromatografia em His-Toyopearl e (b) cromatografia em His-PEVA. Faixa 1: marcadores de massa molecular (Pharmacia, Alemanha) são, respectivamente, tiroglobulina, ferritina, albumina, catalase, lactase dehidrogenase e ferritina. Faixa 2: fração de lavagem com tampão Hepes pH 7,0; faixa 3: fração de eluição com tampão acetato de sódio pH 4,0 com NaCl 1M; faixa 4: IgG humana pré-purificada (Centeon, Alemanha).

Experimentos com soro humano também foram realizados com o intuito de verificar a seletividade dos suportes His-PEVA e His-Toyopearl em adsorver IgG frente a uma maior quantidade de proteínas. O procedimento experimental, como descrito no item 3.2.7 de "Materiais e Métodos", consistiu em alimentar a coluna, contendo o adsorvente, com 2 mL de soro diluídos em 16 mL de tampão Hepes pH 7,0. Durante a cromatografia foram recolhidas e agrupadas amostras das etapas de lavagem e eluição, para serem analisadas, sob condições não redutoras, por eletroforese SDS-PAGE no equipamento Phast System.

No gel de eletroforese mostrado na Figura 4.6, as faixas 2 e 4 representam as proteínas não adsorvidas pelos sistemas. Como observado na faixa 3, o suporte His-PEVA adsorveu IgG, IgM e albumina e na faixa 5, tem-se que o suporte His-Toyopearl adsorveu além destas proteínas, uma outra de massa molecular elevada entre 200 e 900 kDa, visto a

presença de uma banda de proteína entre as bandas de IgG e IgM. Analisando estes resultados, verificou-se que apesar de ambos suportes adsorverem as imunoglobulinas IgG e IgM, classes a que pertencem a maioria dos auto-anticorpos, o sistema His-PEVA apresentou uma maior seletividade, adsorvendo menos contaminantes que o His-Toyopearl. Tendo em vista a aplicação em tratamento extracorpóreo, o qual visa a remoção de auto-anticorpos patogênicos, com um mínimo de adsorção não-específica para evitar a substituição do plasma, seria mais indicando o emprego do suporte His-PEVA.

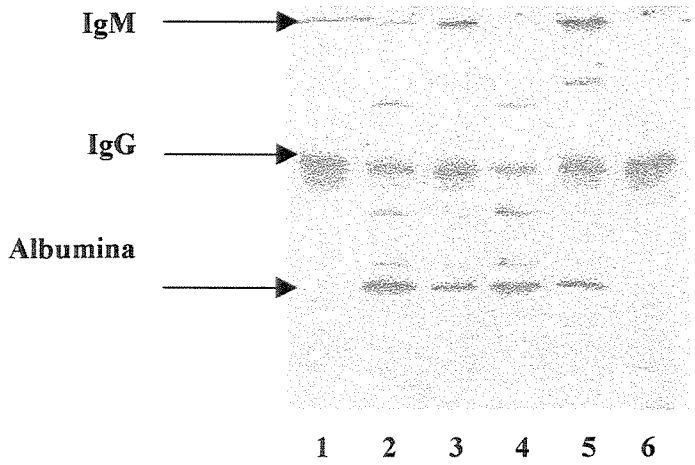


Figura 4.6 : Eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida gradiente 4-15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras obtidas sob condições desnaturantes: Cromatografia em membranas His-PEVA utilizando os tampões Hepes 25mM pH 7,0 e Hepes 25 mM pH 7,0 com NaCl 0,4 M. Faixa 2: fração de lavagem a pH 7,0; faixa 3: fração de eluição a pH 7,0 com NaCl 0,4 M; Cromatografia em gel His-Toyopearl utilizando tampão Hepes pH 7,0 e Hepes pH 7,0 com NaCl 0,4 M. Faixa 4: fração de lavagem a pH 7,0, faixa 5: fração de eluição a pH 7,0 com NaCl 0,4 M. Faixas 1 e 6: IgG humana pré-purificada (Sigma).

4.2.4.- Análise de equilíbrio de adsorção em tanques agitados

Isotermas de adsorção foram construídas, para ambos os adsorventes, com o intuito de determinar a capacidade máxima de adsorção (Qm) e a constante de dissociação (Kd) do complexo IgG-histidina. Nestes experimentos, as massas de IgG adsorvidas foram

calculadas de acordo com a diferença entre as concentrações iniciais e finais dos sobrenadantes.

A isoterma de adsorção de IgG para o sistema His-Toyopearl (Figura 4.7) segue o modelo de Langmuir até uma concentração de equilíbrio de 10 mg/mL, em concentrações mais elevadas a quantidade de proteína adsorvida tende a aumentar (não caracterizando mais um platô), sugerindo a formação de multicamadas no sistema, devido a interações proteína-proteína. Para a obtenção da capacidade máxima e da constante de dissociação foram considerados os valores médios de concentração de equilíbrio e capacidade de adsorção, nos quais o modelo de Langmuir pôde ser ajustado e como os valores de C_{eq} foram muito próximos não foi necessário apresentar o desvio padrão (amplitude), sendo então a isoterma de adsorção representada, como mostra o gráfico da Figura 4.8. Através de uma regressão não linear da equação de Langmuir (2.4) foram determinados os valores de capacidade máxima (Q_m) equivalente a 158,8 ± 13,4 mg proteína/g gel seco e constante de dissociação (K_d) equivalente a 3,0 ± 0,7 x 10^{-5}M.

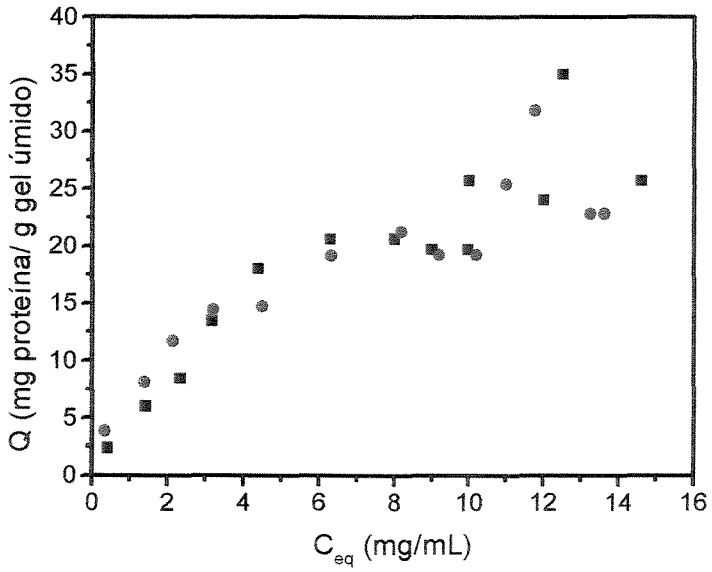


Figura 4.7 : Isoterma de adsorção de IgG, em duplicata, obtida em tanques agitados, à temperatura ambiente, para o suporte His-Toyopearl utilizando o tampão Hepes 25 mM pH 7,0.

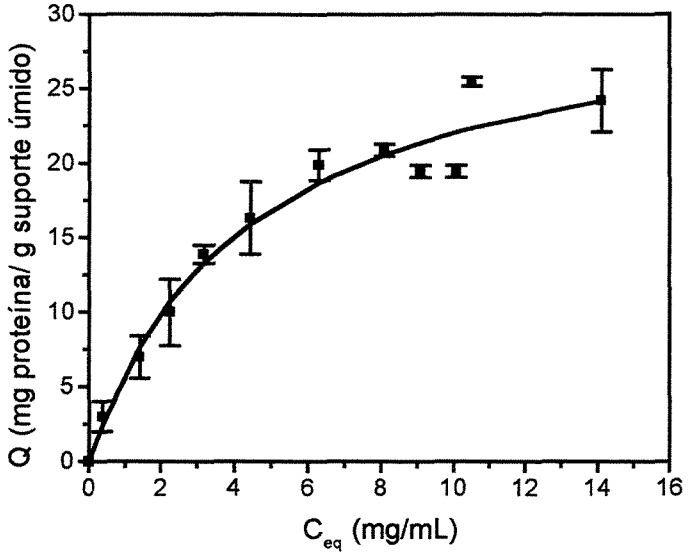


Figura 4.8 : Região da isoterma de adsorção de IgG, à temperatura ambiente, que segue o modelo de Langmuir, para o suporte His-Toyopearl utilizando o tampão Hepes 25 mM pH 7,0. (■) Média dos valores experimentais.

Para uma concentração de equilíbrio próxima a 20 mg/mL, verificou-se uma considerável variação entre a capacidade específica obtida nos experimentos em modo frontal (6,4 mg/g de gel seco) e as obtidas pela análise no equilíbrio através do modelo de Langmuir (125 mg/g gel seco). Essa diferença, que provavelmente também esteja ocorrendo em outras concentrações, pode ser resultado ou da presença de interações muito fracas entre o ligante e a IgG, as quais são rompidas simplesmente com a lavagem do adsorvente ou de interações não-específicas ou de ambos. As interações de natureza não-específicas podem ser interações com a matriz, com o braço espaçador bisoxirano (agente utilizado na ativação do adsorvente) ou interações do tipo proteína-proteína.

O procedimento utilizando o tampão Hepes a pH 7,0, foi realizado apenas para o sistema His-Toyopearl devido a ocorrência de precipitação de proteína, mesmo a baixas concentrações, nos experimentos em His-PEVA. Uma vez que foi observado este fenômeno, o desvio do modelo de Langmuir em altas concentrações de equilíbrio, pode talvez ter sido fruto desta precipitação.

Diante deste fato, optou-se trabalhar com o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4, visto em trabalhos prévios que este tampão, apesar de propiciar uma menor capacidade para

adsorção de IgG que o Hepes, é mais seletivo, uma vez que promove somente a adsorção de IgG_3 e parte de IgG_1 (Bueno *et al.*, 1995B, Haupt *et al.*, 1995). Como descrito em Maran *et al.* (1997), os auto-anticorpos presentes em pacientes com doenças auto-imunes sistêmicas são, em sua maioria, imunoglobulinas G das subclasses 1 e 3. A existência de seletividade com a utilização do tampão Tris-HCl foi também constatada no trabalho desenvolvido por Ventura (2000), onde capacidades de adsorção de auto-anticorpos anti-SS-A/Ro neste tampão superaram em 60% aos valores obtidos com tampão Hepes.

4.3. – Adsorção de IgG nos suportes de afinidade utilizando Tris-HCl como tampão de adsorção

4.3.1 –Seletividade dos suportes de afinidade em presença de tampão Tris-HCl

O objetivo deste estudo foi verificar se a seletividade dos suportes de afinidade seriam alterados ao utilizar o tampão Tris-HCl como tampão de adsorção. Experimentos cromatográficos com soro humano foram realizados com o suporte Toyopearl derivatizado e não-derivatizado, a fim de averiguar se a hipótese da IgG estar interagindo não-especificamente com a matriz seria confirmada.

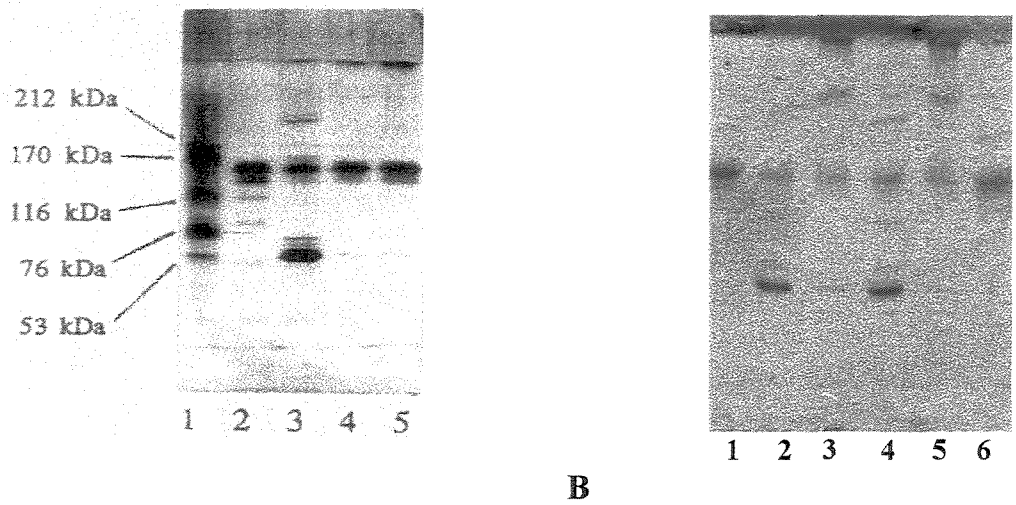
Os experimentos cromatográficos com gel Toyopearl com e sem o ligante histidina imobilizado foram realizados, como descrito no item 3.2.7 de "Materiais e Métodos". As proteínas não adsorvidas foram recolhidas durante a lavagem com o tampão de adsorção Tris-HCl pH 7,4 e as proteínas adsorvidas foram eluídas adicionando-se 0,4 M de NaCl no tampão de adsorção. Em seguida, as frações coletadas em cada pico foram agrupadas, quantificadas (Tabela 4.3), concentradas e analisadas por eletroforese SDS-PAGE no equipamento Phast System, sob condições não redutoras. A seletividade das membranas de PEVA com e sem histidina, foi verificada anteriormente por Bueno *et al.*, 1995A. O procedimento experimental foi o mesmo descrito para o gel Toyopearl, com a diferença que as proteínas adsorvidas pelo sistema His-PEVA foram eluídas consecutivamente com o tampão Tris-HCl pH 7,4 contendo 0,1 e 0,2 M de NaCl, e as adsorvidas pela membrana sem o ligante, foram eluídas completamente com 0,1 M de NaCl.

Tabela 4.3: Quantidades de proteínas obtidas nos picos de eluição para o gel e a membrana derivatizado e não derivatizado. Experimentos cromatográficos com soro humano.

Sistema	Proteínas adsorvidas (mg/g suporte seco)		Fonte
	Sem ligante	com ligante	
Gel Toyopearl	0,34	0,65	Este trabalho
Membrana de PEVA	0,42	3,5	Bueno, 1995

A Figura 4.9 apresenta os géis de eletroforese A e B obtidos, respectivamente para a membrana com ligante e para o gel Toyopearl com e sem a presença do ligante histidina. Analisando as faixas 4 e 5 do gel A, que correspondem, respectivamente, às proteínas adsorvidas em His-PEVA e eluídas com 0,1 M e 0,2 M de NaCl, verificou-se que este sistema adsorveu IgM, IgG e uma pequena quantidade de albumina (Bueno *et al.*, 1995A). Em contraste, a membrana de PEVA sem derivatização adsorveu 12 % do total de proteínas adsorvidas pelo sistema His-PEVA, sendo elas principalmente IgG e traços de albumina (Figura não mostrada, Bueno *et al.*, 1995A). Analisando as faixas 3 e 5 do gel B, que correspondem às proteínas adsorvidas, respectivamente, em His-Toyopearl e no gel Toyopearl sem derivatização, verificou-se que ambos sistemas adsorveram IgG, albumina, provavelmente IgM e outras proteínas contaminantes. Estes resultados demonstram que, para ambos suportes, membrana e gel, a presença do ligante histidina não influenciou na seletividade do sistema.

Comparando a seletividade dos adsorventes derivatizados, tem-se que o sistema His-Toyopearl adsorveu uma maior quantidade de contaminantes do que o His-PEVA, sendo portanto, este último, mais seletivo para a adsorção de IgG. Analisando também a seletividade dos suportes em relação ao tampão empregado, através das Figuras 4.6 e 4.9, verificou-se aparentemente que na presença do tampão Tris-HCl pH 7,4, ambos os suportes adsorveram uma quantidade menor de albumina do que na presença do tampão Hepes pH 7,0.



A B

Figura 4.9 : Gel A: Eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida gradiente 4-15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras obtidas sob condições desnaturantes e não-redutoras: Cromatografia em His-PEVA com soro humano (Bueno *et al.*, 1995A). Faixa 1: marcadores de massa molecular (miosina, 212 kDa; α_2–macroglobulina, 170 kDa; β-galactosidase, 116 kDa, transferrina 76 kDa e desidrogenase glutâmica, 53 kDa); faixa 2: IgG pré-purificada (Institut Mérieux, França); faixa 3: fração de lavagem pH 7,4; faixa 4: fração de eluição pH 7,4 com NaCl 0,1 M; faixa 5: fração de eluição pH 7,4 com NaCl 0,2 M. Gel B: Eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida gradiente 4-15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras obtidas sob condições desnaturantes e não-redutoras: Cromatografia em gel His-Toyopearl com soro humano. Faixa 2: fração de lavagem pH 7,4; faixa 3: fração de eluição pH 7,4 com NaCl 0,4 M. Cromatografia em gel Toyopearl. Faixa 4: fração de lavagem pH 7,4; faixa 5: fração de eluição pH 7,4 com NaCl 0,4 M. Faixas 1 e 6: IgG humana pura (Sigma, EUA).

4.3.2 – Determinação da capacidade de adsorção dos suportes em modo frontal

A capacidade de adsorção dos suportes His-PEVA e His-Toyopearl foi determinada na presença do tampão Tris-HCl pH 7,4, como descrito no item 3.2.8 de "Materiais e Métodos". Os adsorventes foram saturados com uma solução de IgG de 20 mg/mL, em seguida a quantidade de proteína não adsorvida foi removida da coluna através da lavagem com tampão de adsorção. A proteína adsorvida foi eluída com tampão acetato de sódio pH 4,0 com NaCl 1 M e, por fim, os suportes foram regenerados com uma solução de NaOH a

25 mM. As Figuras 4.10 e 4.11 mostram os cromatogramas típicos obtidos respectivamente, para o suporte His-PEVA e His-Toyopearl. Na Tabela 4.4 estão apresentadas as quantidades de IgG obtidas nas etapas de eluição e regeneração e os valores de capacidade de adsorção (mg proteína/g de suporte seco) para cada adsorvente. Os resultados indicam que o sistema His-PEVA adsorveu uma maior quantidade de proteína (14 mg/g suporte seco), apresentando uma capacidade de adsorção aproximadamente quatro vezes maior do que o sistema His-Toyopearl (3,8 mg/g suporte seco).

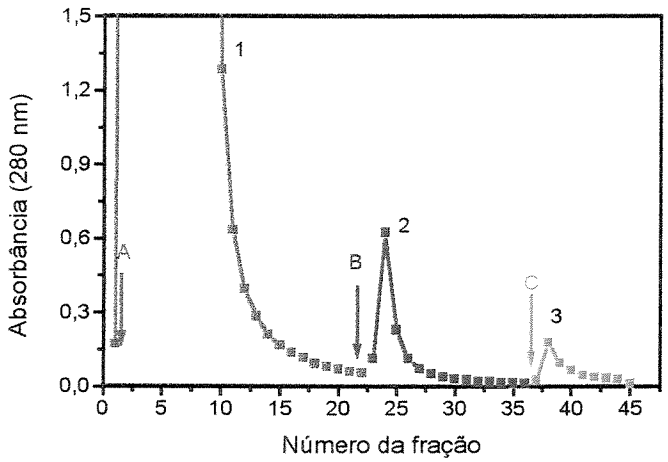


Figura 4.10: Cromatografia de IgG pré-purificada saturando a coluna contendo membrana His-PEVA. Injeção de 13 mL de IgG humana a 20 mg/mL. Tampão de lavagem, Tris-HCl 25 mM pH 7,4 (▲); tampão de dessorção, acetato de sódio 25 mM pH 4,0 com NaCl 1 M (■) , solução de regeneração, hidróxido de sódio 25 mM (▲); vazão 0,4 mL/min; volume das frações, 2,4 mL. As setas indicam início das etapas de lavagem (A), dessorção (B) e regeneração (C). Os números de 1 a 3 indicam os picos de proteína obtidos.

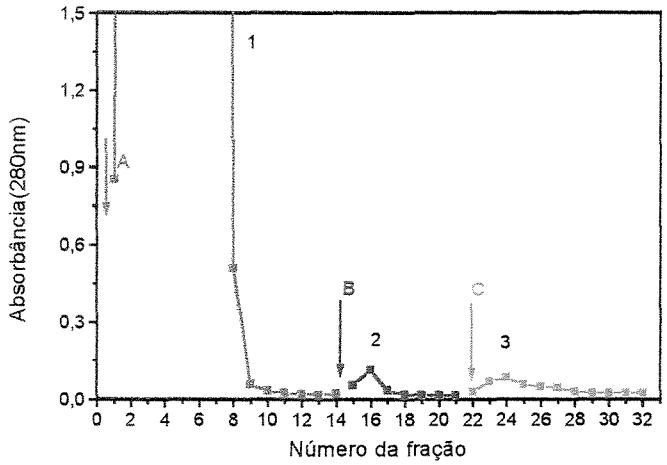


Figura 4.11: Cromatografia de IgG pré-purificada saturando a coluna contendo gel His-Toyopearl. Injeção de 13 mL de IgG humana a 20 mg/mL. Tampão de lavagem, Tris-HCl 25 mM pH 7,4 (■); tampão de dessorção, acetato de sódio 25 mM pH 4,0 com NaCl 1 M (■), solução de regeneração, hidróxido de sódio 25 mM (■); vazão 0,4 mL/min; volume das frações, 2,4 mL. As setas indicam início das etapas de lavagem (A), dessorção (B) e regeneração (C). Os números de 1 a 3 indicam os picos de proteína obtidos.

Tabela 4.4 Capacidade de adsorção dos suportes His-Toyopearl e His-PEVA obtidas de experimentos em modo frontal com tampão de adsorção Tris-HCl pH 7,4.

	Massa de IgG na eluição (mg)	Massa de IgG na regeneração (mg)	IgG adsorvida (mg)	IgG adsorvida (mg/g suporte seco)
His-Toyopearl	0,4	0,8	1,2	3,8
His-PEVA	2,3	0,8	3,1	14

Na Tabela 4.5, a capacidade de adsorção dos suportes é apresentada em função do tampão utilizado. Verifica-se que na presença de ambos tampões, o sistema His-PEVA apresenta uma maior capacidade para adsorção de IgG. Como constatado anteriormente por Haupt *et al.*, 1995, Ventura, 2000 e também neste estudo, o tampão Tris-HCl proporciona uma menor capacidade de adsorção de IgG do que o tampão Hepes. Uma hipótese para explicar este fato seria que o tampão Tris-HCl interage com a proteína via carga, ocultando

o sítio de ligação da histidina, e como o Hepes em pH 7,0 está na sua forma zwiteriônica (carga total nula), esta interação não acontece (Haupt *et al.*, 1995).

Tabela 4.5 – Comparação das capacidades de adsorção dos suportes His-PEVA e His-Toyopearl empregando os tampões de adsorção Hepes pH 7,0 e Tris-HCl pH 7,4.

	Tampão	IgG adsorvida (mg)	IgG adsorvida (mg/g suporte seco)
His-Toyopearl	**Hepes pH 7,0**	**2,0**	**6,4**
	Tris-HCl pH 7,4	**1,2**	**3,8**
His-PEVA	**Hepes pH 7,0**	**11,0**	**50**
	Tris-HCl pH 7,4	**3,1**	**14**

4.3.3 – Isotermas de adsorção de IgG

A partir da análise de equilíbrio, foram obtidas isotermas de adsorção com a finalidade de determinar os parâmetros capacidade máxima e a constante de dissociação do complexo IgG-histidina, segundo o procedimento experimental descrito no item 3.2.9 de "Materiais e Métodos". Dependendo da forma da isoterma, os parâmetros foram determinados através da regressão não linear da equação 2.4 do modelo de Langmuir ou da regressão linear da equação 2.5 do modelo de Henry. Para averiguar possíveis interações não-específicas entre o adsorvente e a proteína, foram determinadas isotermas de adsorção para a membrana de PEVA e para o gel Toyopearl, com e sem o ligante histidina imobilizado. Visando a aplicação em tratamento extracorpóreo, os experimentos foram realizados à temperatura ambiente e à 37°C (temperatura do corpo humano), para averiguar se alterações na capacidade de adsorção dos suportes ocorreriam com o aumento de temperatura.

Capítulo 4

Isotermas de adsorção de IgG à temperatura ambiente

As isotermas de adsorção à temperatura ambiente estão apresentadas nas Figuras 4.12 e 4.13, para a membrana de PEVA e para o gel Toyopearl, com e sem ligante imobilizado. Para ambas as matrizes de PEVA, não foram atingidos platôs bem definidos à altas concentrações de equilíbrio, como visualizado através das isotermas de adsorção. Os gráficos de Scatchard apresentados na Figura A2 (anexo A) demonstraram que os dados experimentais não foram muito bem representados pelo modelo de Langmuir, apesar desta análise foi verificado que a diferença entre o ponto experimental e o ponto calculado com os parâmetros ajustados pelo modelo de Langmuir, apresenta um valor médio menor que a amplitude do erro experimental, sendo respectivamente 1,1 e 1,3 para o suporte His-PEVA. Constatou-se uma considerável presença de interações não-específicas entre a proteína e a matriz, uma vez que altas capacidades de adsorção foram obtidas para a membrana não derivatizada. O valor da capacidade máxima obtido através do ajuste de parâmetros do modelo de Langmuir para o sistema His-PEVA foi somente cerca de 30% maior que aquela obtida para o sistema não derivatizado (Tabela 4.6). Esses resultados obtidos a partir das isotermas, as quais foram determinadas através da diferença entre as concentrações iniciais e finais dos sobrenadantes, mostraram para este sistema, que o ligante histidina desempenha um papel pouco relevante na eficiência do sistema.

A diferença percentual de 30% obtida entre as capacidades de adsorção das membranas derivatizadas e não-derivatizadas foi bem menor do que aquela obtida por Bueno *et al.*, 1995A (88%). A discrepância entre os resultados talvez se deva à diferenças na concentração, conteúdo da amostra inicial injetada nos adsorventes e a condições operacionais. Neste experimento, as isotermas de adsorção de IgG foram determinadas a partir de soluções de IgG pré-purificada, através da diferença entre as concentrações iniciais e finais dos sobrenadantes. Os experimentos realizados por Bueno *et al.*, 1995A foram realizados em modo dinâmico utilizando soro humano diluído (concentração de IgG de 3 mg/mL) e a quantidade de IgG adsorvida nos suportes foi determinada a partir da fração eluída com NaCl (após a lavagem da coluna com tampão de equilíbrio). Neste caso, a lavagem da coluna, contendo as fibras finamente cortadas, provavelmente removeu as proteínas que estavam fracamente adsorvidas nos suportes por interações não-específicas, aumentando a eficiência do sistema.

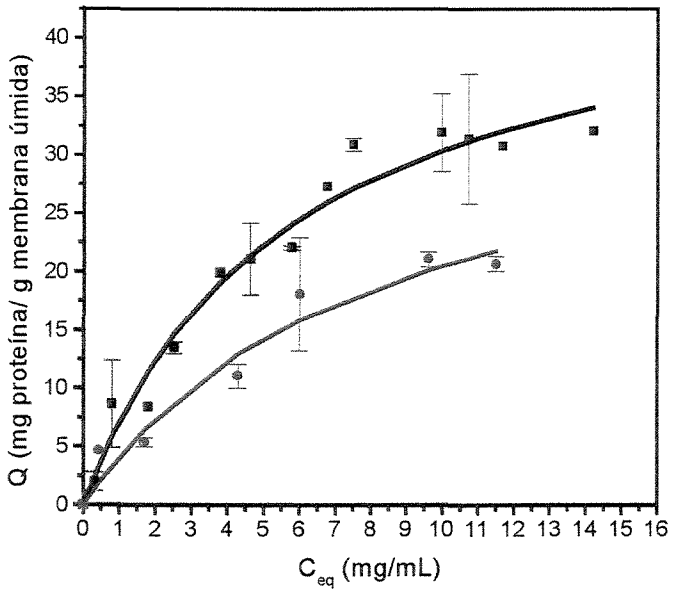


Figura 4.12 – Isotermas de adsorção de IgG à temperatura ambiente para: (●) membrana de PEVA não derivatizada e (■) para His-PEVA, utilizando o tampão Tris-HCl pH 7,4.

Verificou-se através do gráfico de Hill (Figura B1-Anexo B) que as isotermas obtidas para o suporte His-PEVA, apesar de não apresentaram um comportamento Langmuriano, exibiram um coeficiente de cooperatividade (n) igual 1, ou seja, uma ausência de cooperatividade devido a interações laterais proteína-proteína ou proteína-matriz, como constatado anteriormente por Bueno *et al.*, 1995A. Apesar da ausência de cooperatividade, o fato do modelo de Langmuir não ter ajustado bem os dados experimentais, sugere que provavelmente outros tipos de interações não-específicas estejam ocorrendo, devido a heterogeneidade da superfície, onde uma das interações seria hidrofóbica, ou a presença de sítios múltiplos de ligação na proteína (Luo e Andrade, 1998).

As isotermas de adsorção obtidas para o gel Toyopearl com e sem ligante imobilizado aparentemente seguiram o modelo de Langmuir até a concentração de equilíbrio de 6 a 7 mg/mL (Figura 4.13), entretanto acima deste valor a quantidade de proteína adsorvida aumentou, descaracterizando o sistema. A Figura 4.14 mostra que as

isotermas de adsorção para o suporte His-Toyopearl e para o gel Toyopearl são similares na faixa de concentração na qual o modelo de Langmuir foi ajustado. Os resultados apresentados na Tabela 4.6 indicam uma diferença de apenas 10% entre a capacidade máxima de ambos sistemas, mostrando para este adsorvente que o ligante histidina desempenha um papel irrelevante na eficiência do sistema.

Através dos gráficos de Scatchard apresentados nas Figuras A3 e A4 (anexo A), verificou-se que as isotermas de adsorção para His-Toyopearl não seguem o modelo de Langmuir, apesar disto foi verificado que a diferença entre o ponto experimental e o ponto calculado com os parâmetros ajustados pelo modelo de Langmuir, apresentou um valor médio menor que a amplitude do erro experimental, sendo estes valores, respectivamente, de 0,6 e 0,8 para o suporte His-Toyopearl. Uma análise posterior através do gráfico de Hill, apresentado na Figura B2 (anexo B), confirma a presença de cooperatividade positiva no sistema His-Toyopearl, devido a obtenção de um coeficiente de cooperatividade (n) igual a 1,23. Este resultado sugere a presença de interações laterais atrativas entre proteína-proteína e proteína-adsorvente, segundo Luo e Andrade, 1998 e Gill *et al.*, 1994.

Além disto, o aumento na capacidade de adsorção do suporte obtido a partir de concentrações de IgG em equilíbrio de 7 mg/mL, como visualizado na Figura 4.13, sugere a probabilidade da formação de multicamadas de proteína durante a adsorção de IgG no suporte His-Toyopearl. Diante desta possibilidade foi testado um modelo proposto por Langmuir, 1918, apresentado na equação 2.6, o qual não se ajustou aos dados experimentais, provavelmente, devido à simplificação do modelo uma vez que este considera que as interações entre a primeira e a segunda camada como sendo a mesma entre as outras camadas subsequentes (Anspach *et al.*, 1996).

Em relação a formação do complexo IgG-histidina, verificou-se que tanto para a membrana quanto para o gel, a ausência do ligante não alterou a ordem de grandeza da constante de dissociação de 10^{-5} M. Entretanto, valores de K_d um pouco maiores foram obtidos, para ambas matrizes, na ausência do ligante, significando que a interação é um pouco mais fraca do que no suporte contendo o ligante imobilizado.

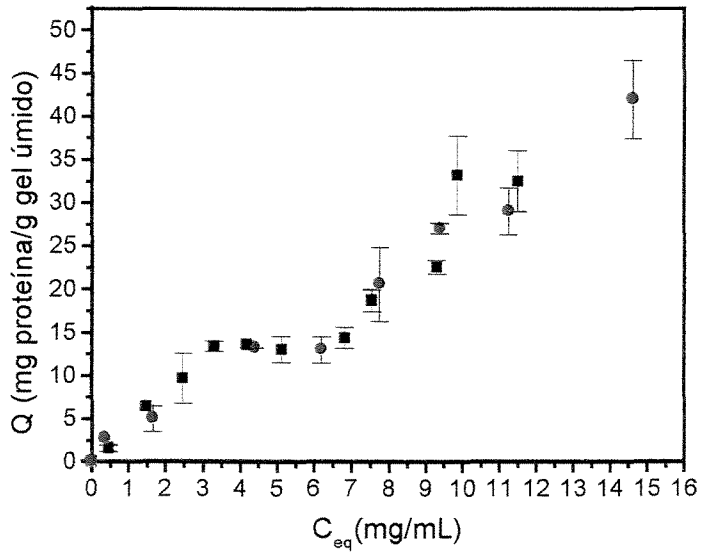


Figura 4.13 –Isoterma de adsorção de IgG à temperatura ambiente para (●) gel Toyopearl não derivatizado e (■) His- Toyopearl, utilizando o tampão Tris-HCl pH 7,4. (Inclui todos os pontos experimentais).

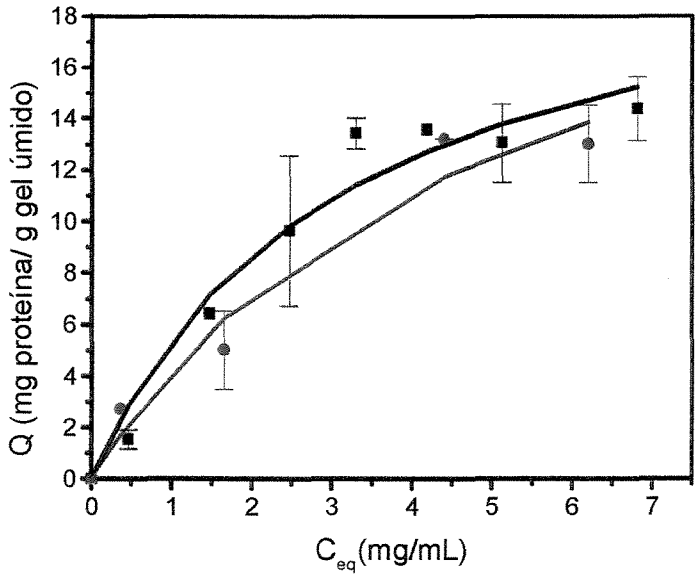


Figura 4.14 – Região das isotermas de adsorção de IgG, à temperatura ambiente, que seguem o modelo de Langmuir para: (●) gel Toyopearl não derivatizado e (■) His-Toyopearl, utilizando o tampão Tris-HCl pH 7,4.

Tabela 4.6- Parâmetros obtidos, à temperatura ambiente, a partir do ajuste do modelo de Langmuir aos dados das isotermas de adsorção dos suportes derivatizados e não derivatizados.

Suporte	Q_m				K_d	
	Sem ligante		Com ligante		Sem ligante	Com ligante
	mg/g	mg/mL	mg/g	mg/mL	(M)	(M)
Gel Toyopearl	124 ,5 ± 46,0	38,9	110,0 ± 17,5	34,4	3,2 ± 2,3 x 10^{-5}	2,0 ± 0,7 x 10^{-5}
Membrana de PEVA	126,9 ± 32,7	110,3	163,8 ± 13,9	142,4	5,3 ± 2,7 x 10^{-5}	3,7 ± 0,7 x 10^{-5}

Isotermas de adsorção de IgG à temperatura de 37 °C

A capacidade de adsorção de IgG também foi avaliada à 37 °C, tendo em vista que durante o tratamento extracorpóreo, o sangue do paciente encontra-se nesta temperatura. Foi verificado, para os suportes estudados, que a capacidade de adsorção aumentou com o aumento da temperatura, resultado também constatado por Haupt *et al.*, 1995 para o sistema His-PEVA.

Verificou-se que na temperatura de 37 °C, as isotermas de adsorção de IgG para a membrana de PEVA com e sem o ligante histidina, visualmente seguem o modelo de Langmuir (Figura 4.15). Os gráficos de Scatchard (Figura A5 (anexo A)) demonstraram o desvio dos dados experimentais ao modelo de Langmuir, entretanto a diferença entre o ponto experimental e o ponto calculado com os parâmetros ajustados pelo modelo de Langmuir, apresentou um valor médio menor que a amplitude do erro experimental. Como a membrana de PEVA é constituída por 30% de grupamentos hidrofóbicos, um aumento da temperatura pode favorecer interações não-específicas do tipo hidrofóbica entre a proteína e a matriz. Apesar disto, os valores de capacidade máxima apresentados na Tabela 4.7 demonstraram que a presença do ligante histidina favoreceu um aumento na capacidade de adsorção destes sistemas.

Analisando o gráficos de Hill, apresentados na Figura B3 (anexo B), verificou-se que o aumento de temperatura não favoreceu interações laterais do tipo proteína-proteína ou proteína-adsorvente, visto que o coeficiente de cooperatividade foi igual a 0,94. Como sugerido para a temperatura ambiente, a heterogeneidade da superfície ou a presença de sítios múltiplos de ligação na IgG, podem ser os fatores relevantes para o desvio Langmuriano da isoterma de adsorção.

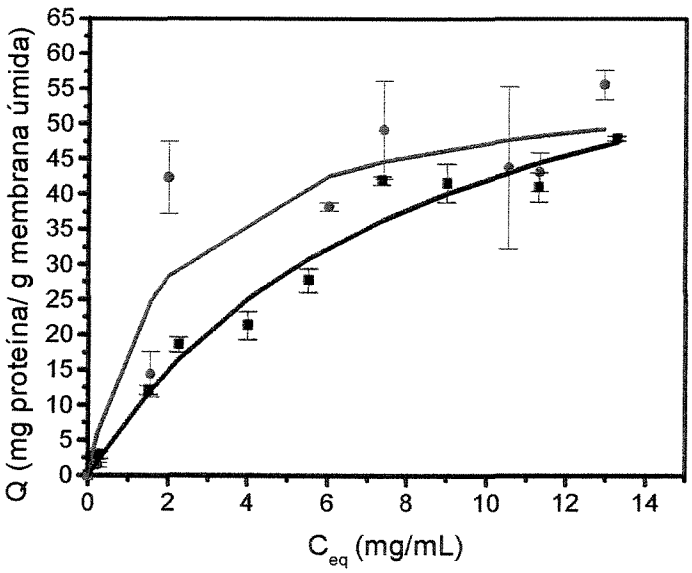


Figura 4.15 — Isotermas de adsorção de IgG à temperatura de 37 °C para: (●) membrana de PEVA não derivatizada e (■) para-His-PEVA, utilizando o tampão Tris-HCl pH 7,4.

A isoterma de adsorção para o gel Toyopearl não derivatizado foi representada pelo modelo de Langmuir (Figura 4.16), apesar do gráfico de Scatchard da Figura A6 (anexo A), demonstrar que o modelo não se aplica bem ao sistema, pois a diferença entre o ponto experimental e o ponto calculado com os parâmetros ajustados pelo modelo de Langmuir, apresentou um valor médio menor que a amplitude do erro experimental. A presença de adsorção não-específica na matriz pode ser explicada pelo fato do gel Toyopearl, apesar de hidrofílico, apresentar uma tendência hidrofóbica, dependendo de condições como pH,

força iônica, temperatura e outras (Hermanson *et al.*, 1992). Assim, o aumento da temperatura provavelmente favoreceu as interações hidrofóbicas entre a proteína e a matriz, aumentando a capacidade de adsorção de IgG.

O aumento de temperatura pode ter favorecido não só as interações entre a proteína e a matriz, mas também proteína-proteína e proteína-braço espaçador bisoxirano (no caso do suporte derivatizado). O fato da isoterma de adsorção de IgG para o suporte His-Toyopearl ter apresentado um comportamento linear, pode ser talvez explicado a partir destes fenômenos (Figura 4.16), apesar de não ser possível a obtenção de um coeficiente de cooperatividade, para confirmar a análise.

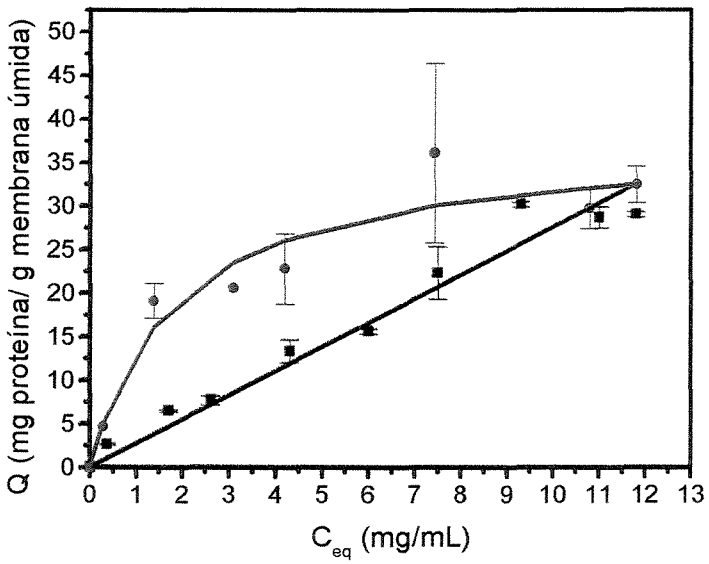


Figura 4.16 – Isotermas de adsorção de IgG à temperatura de 37 °C, para: (●) gel Toyopearl não derivatizado e (■) His-Toyopearl, utilizando o tampão Tris-HCl pH 7,4.

Tabela 4.7- Parâmetros obtidos, à 37 °C, a partir do ajuste do modelo de Langmuir aos dados das isotermas de adsorção dos suportes derivatizados e não derivatizados.

Suporte	Q_m				K_d	
	Sem ligante		Com ligante		Sem ligante	Com ligante
	mg/g	mg/mL	mg/g	mg/mL	(M)	(M)
Gel Toyopearl	187,5 ± 20,0	58,7	Nd		1,2 ± 0,5 x 10^{-5}	2,8 ± 0,1*
Membrana de PEVA	196,2 ± 28,9	170,6	265,5 ± 38,9	230,9	1,3 ± 0,8 x 10^{-5}	5,5 ± 1,6 x 10^{-5}

Nd = não determinado; * constante de Henry em mL/g

Comparação entre os sistemas His-PEVA e His-Toyopearl à temperatura ambiente e a 37°C

Para comparar a adsorção de IgG nos suportes His-PEVA e His-Toyopearl, alguns aspectos devem ser esclarecidos. Apesar da membrana apresentar como vantagem a possibilidade de fluxo convectivo no interior dos poros, não foram realizadas operações de filtração, portanto a transferência de massa tanto no gel como na membrana foi governada pela difusão. Como os experimentos de adsorção foram realizados em condições de equilíbrio, as diferenças na capacidade de adsorção dos sistemas foi avaliada em função da densidade de ligantes e das interações específicas e não-específicas nos suportes (estrutura das matrizes).

Com a finalidade de facilitar a comparação, as isotermas de adsorção e os parâmetros ajustados, obtidos à temperatura ambiente e a 37 °C, para os sistemas His-PEVA e His-Toyopearl estão, em conjunto, apresentadas na Figura 4.17 e Tabela 4.8, respectivamente. Através dos parâmetros determinados nos ajustes não lineares, verifica-se para a temperatura ambiente, que o sistema His-Toyopearl apresenta uma capacidade de adsorção cerca de 1,5 e 4,0 vezes menor que o sistema His-PEVA, quando comparados em termos de massa e volume de adsorvente, respectivamente Uma possível explicação para este resultado seria que a adsorção de IgG em His-Toyopearl seja desfavorecida devido a

impedimentos estéricos. A eficiência de utilização dos ligantes seria diminuída devido a elevada densidade de ligantes imobilizados no gel, uma vez que o suporte derivatizado está sendo utilizado para a adsorção de uma proteína de alta massa molecular como IgG. A presença de cooperatividade positiva no sistema His-Toyopearl sugere que esteja ocorrendo interações proteína-proteína, bem como proteína-adsorvente, provocando uma mudança conformacional na proteína, através da adsorção em multipontos da sua superfície (Luo e Andrade, 1998).

Além de apresentar menor capacidade de adsorção, o gel His-Toyopearl está limitado à utilização em baixas concentrações iniciais de IgG, devido a formação de multicamadas em concentrações mais elevadas. Tendo em vista que a concentração de IgG no plasma de pacientes com doenças auto-imunes, pode atingir níveis elevados, a utilização do suporte His-Toyopearl para a remoção de auto-anticorpos patogênicos seria dificultada.

A comparação entre as capacidades máximas alcançadas a 37 °C ficou prejudicada, uma vez que a isoterma obtida para o sistema His-Toyopearl se mostrou linear, não sendo possível a determinação da capacidade máxima deste sistema. Comparando as isotermas de adsorção para His-PEVA e para His-Toyopearl a 37 °C, nota-se que o aumento de temperatura favoreceu a adsorção de IgG para o sistema His-PEVA. No sistema His-Toyopearl a saturação não foi atingida, provavelmente devido a interações hidrofóbicas entre a proteína, a matriz e o braço espaçador, bem como interações proteína-proteína ocasionando a formação de multicamadas. As quantidades de IgG adsorvidas quando comparadas entre os sistemas em todas as concentrações de equilíbrio, mostra uma maior capacidade de adsorção do His-PEVA. Em relação a afinidade, os suportes não podem ser comparados a esta temperatura, já que a constante de Henry determinada para o gel não tem o mesmo significado físico da constante de Langmuir. Quando o modelo de Langmuir pôde ser aplicado, os valores da constante de dissociação foram calculados, sendo da ordem de 10^{-5}M para ambos suportes, indicando uma afinidade média de histidina por IgG, característica dos ligantes pseudobioespecíficos.

Comparando estes resultados com os de literatura, verifica-se que o suporte His-Toyopearl possui uma maior eficiência para a adsorção de IgG (34,4 mg/mL) quando comparado aos sistemas que empregam proteína A imobilizada em géis de agarose, cuja capacidade de adsorção está em torno de 20 mg/mL (Malchesky *et al.*, 1993). O sistema His-PEVA (capacidade de adsorção de IgG de 142,4 mg/mL) tem demonstrado também

uma capacidade máxima superior, quando comparado aos resultados obtidos por Charcosset *et al*, 1995 e Klein *et al.*, 1994B, nos sistemas proteína A-hidroxietilcelulose-membranas de polietersulfona (8,8 mg/mL) e proteína A-quitosana-membranas de poliétersulfona (41 mg/mL).

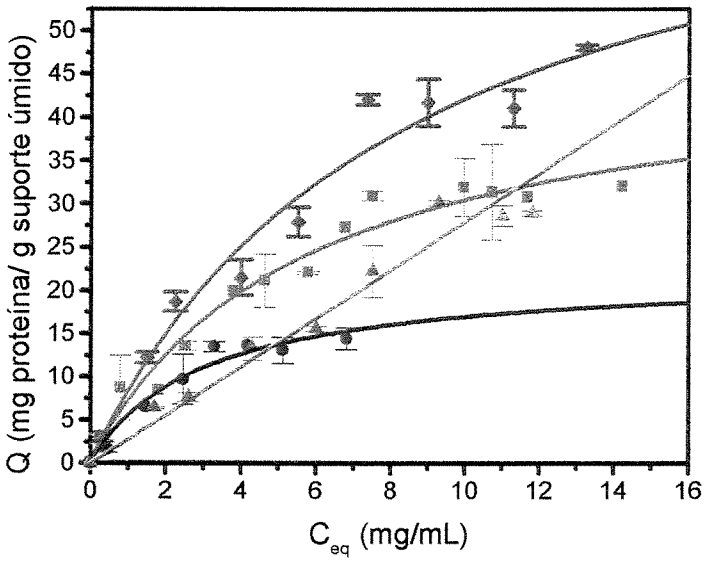


Figura 4.17 – Isotermas de adsorção de IgG à temperatura ambiente para os sistemas His-PEVA (■) e (●) His-Toyopearl e à 37 °C para His-PEVA (◆) e His-Toyopearl (▲), utilizando o tampão Tris-HCl pH 7,4. A curva cheia de cada isoterma corresponde a uma "spline" dos pontos.

Tabela 4.8 : Parâmetros obtidos, à temperatura ambiente e à 37 °C, a partir do ajuste do modelo de Langmuir aos dados das isotermas de adsorção para os suportes derivatizados.

Suporte	Temperatura (°C)	Q_m mg/g seco	Q_m mg/mL	K_d (M)
His Toyopearl	25	110,0 ± 17,5	34,4	2,0 ± 0,7 x 10^{-5}
	37	Nd		2,8 ± 0,1*
Membrana de PEVA	25	163,8 ± 13,9	142,4	3,7 ± 0,7 x 10^{-5}
	37	265,5 ± 38,9	230,9	5,5 ± 1,6 x 10^{-5}

Nd = não determinado; * constante de Henry em mL/g

A análise das isotermas de adsorção demontrou que o sistema His-PEVA é mais eficiente para a adsorção de IgG do que o His-Toyopearl, entretanto é bastante significativa a ocorrência de interações não-específicas, em ambos sistemas. Como nos experimentos em tanques agitados, a massa total de proteína adsorvida foi calculada pela variação entre as concentrações iniciais e finais dos sobrenadantes, os resultados obtidos para a capacidade máxima de adsorção engloba tanto as interações específicas como não-específicas de IgG nos suportes. Devido a este fato, fez-se necessário a realização de uma avaliação mais adequada, onde fossem efetuadas as etapas de lavagem, eluição e regeneração, após ser atingido o equilíbrio.

4.3.4.- Análise de equilíbrio de adsorção considerando as etapas de eluição e regeneração dos suportes

Neste procedimento, após ser atingido o equilíbrio de adsorção, a quantidade de proteína fracamente adsorvida pelo suporte foi removida com o tampão Tris-HCl a pH 7,4, em seguida, a proteína fortemente adsorvida foi eluida com o tampão acetato pH 4,0 contendo 1 M de NaCl e com uma solução de NaOH 25 mM (solução de regeneração), como descrito no item 3.2.10 de "Materiais e Métodos". As frações de eluição e regeneração foram analisadas a 280 nm, para determinar a quantidade de IgG adsorvida especificamente pelos suportes e os valores estão mostrados na Tabela 4.9.

Capítulo 4

Tabela 4.9 – Capacidade de adsorção de IgG à temperatura ambiente, para os suportes derivatizados e não derivatizados. Experimentos considerando as etapas de lavagem, eluição e regeneração.

		Eluição (mg/g suporte seco)		Regeneração (mg/g suporte seco)		IgG adsorvida* (mg prot./g suporte seco)	
Suporte	Co (mg/ml)	Sem ligante	Com ligante	Sem ligante	Com ligante	Sem ligante	Com ligante
Gel Toyopearl	2,0	3,5	2,3	4,0	2,4	7,5	4,7
	16,0	7,2	3,7	3,3	5,1	10,5	8,8
Membrana de PEVA	2,0	1,8	4,6	2,2	3,3	4,0	8,0
	16,0	3,3	9,0	4,0	7,3	7,3	16,3

Co = concentração inicial de proteína
***IgG adsorvida = soma dos valores obtidos nas etapas de eluição e regeneração**

Para os suportes sem ligante, constatou-se a ocorrência de interações não-específicas entre a proteína e a matriz, para ambos sistemas, sendo maior no gel (7,5 e 10,5 mg/g suporte seco) do que na membrana (4 e 7,3 mg/g suporte seco) (Tabela 4.9). Os valores da quantidade de IgG adsorvida obtidos para o gel demonstraram uma maior adsorção não-específica de IgG na matriz do que específica no ligante, em ambas concentrações. Em acordo com as isotermas obtidas na Figura 4.14, este resultado demonstra pouca influência do ligante na adsorção de proteína. Inversamente, os resultados de dessorção em His-PEVA demonstraram uma maior adsorção específica de IgG no ligante do que não-específica na matriz (cerca de 100% maior), indicando a importância do ligante no processo de adsorção deste sistema.

Comparando as capacidades de adsorção (mg proteína/g suporte seco) dos suportes derivatizados, verificou-se que o suporte His-PEVA adsorveu uma quantidade de proteína duas vezes maior que o sistema His-Toyopearl. Apesar do gel Toyopearl apresentar uma maior densidade de ligantes (44 μmol/mL) e uma maior área superficial (105 m^2/g suporte seco), o suporte His-PEVA, que possui uma densidade de ligantes de 20 μmol/mL e área superficial de 49,5 m^2/g suporte seco, tem demonstrado uma maior eficiência para a

adsorção de IgG. Como o mecanismo de adsorção de IgG em histidina imobilizada não está completamente elucidado, sugere-se que diferenças estruturais possam ser responsáveis pela variação na capacidade de adsorção. Uma das hipóteses seria que na membrana de PEVA os ligantes estão bem distribuídos e mais acessíveis à proteína, enquanto que no gel, uma densidade elevada de ligantes pode ocasionar uma menor adsorção de proteínas, devido a impedimentos estéricos favorecendo interações do tipo proteína-proteína que levam a formação de multicamadas.

4.4 – Cinética de adsorção de IgG

Com o objetivo de determinar as constantes cinéticas de adsorção e dessorção de IgG nos suportes His-PEVA e His-Toyopearl, foram realizados experimentos como descrito no item 3.2.11 de "Materiais e Métodos". As constantes cinéticas de adsorção e dessorção foram determinadas para os sistemas, através da expressão da taxa de variação da concentração de proteína na fase líquida com o tempo (equação 2.8). Neste modelo simplificado, proposto por Skidmore *et al.*, 1990 é considerado que a taxa de reação na superfície é a etapa mais lenta do processo de adsorção. Nas Figuras 4.20 e 4.21 estão mostradas as curvas experimentais e teóricas obtidas em diferentes concentrações para cada adsorvente. As curvas teóricas foram obtidas substituindo as constantes cinéticas, na expressão 2.9 (solução analítica da equação 2.8), para determinar novos valores de concentração para os tempos indicados. Na Tabela 4.10 estão apresentados os valores das constantes cinéticas dos sistemas His-PEVA e His-Toyopearl obtidas pelo ajuste da equação 2.7 aos dados experimentais.

O perfil das curvas cinéticas mostrou uma rápida cinética de adsorção, para ambos suportes, onde o equilíbrio foi atingido nos primeiros minutos da análise, como mostrado nas Figuras 4.18 e 4.19.

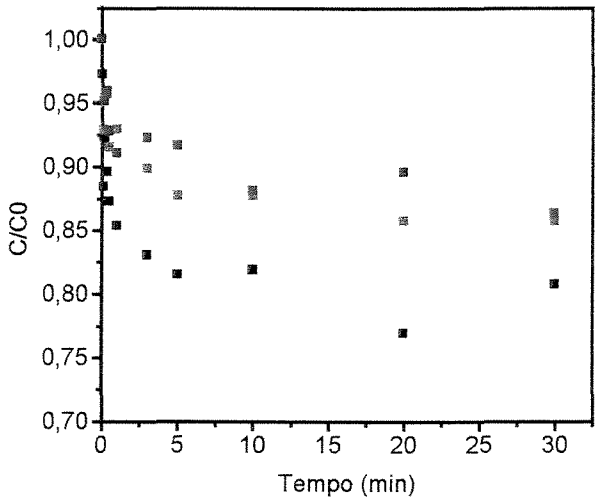


Figura 4.18: Curvas cinéticas obtidas para o sistema His-PEVA, à temperatura ambiente, nas concentrações iniciais de 0,26; 3,0 e 7,3 mg/mL .

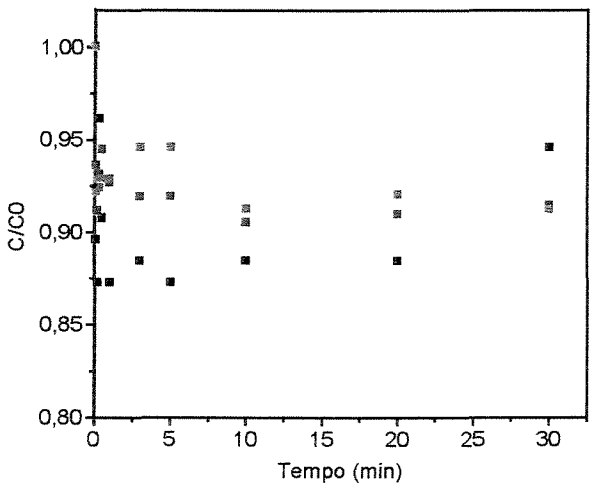


Figura 4.19- Curvas cinéticas obtidas para o sistema His-Toyopearl, à temperatura ambiente, nas concentrações iniciais de 0,26; 3,0 e 9,0 mg/mL .

As curvas cinéticas apresentadas nas Figuras 4.20 e 4.21 mostraram para os sistemas His-PEVA e His-Toyopearl, um desvio considerável entre os resultados teóricos e experimentais, exceto para o gel na concentração de 9 mg/mL. Uma explicação para este resultado seria que a adsorção de IgG nestes suportes pode ser controlada pela difusão no interior dos poros ou transferência de massa no filme líquido, não sendo o modelo de Skidmore *et al.*, 1990, o mais adequado para representar a cinética dos sistemas. No caso do suporte His-Toyopearl, o modelo foi melhor ajustado aos dados experimentais na concentração mais elevada de 9,0 mg/mL, sugerindo que a adsorção na superfície seja a etapa mais lenta do processo. Em concentrações mais elevadas, os ligantes já estão saturados e prevalece interações na superfície do tipo proteína-proteína, formando multicamadas, que podem dificultar a difusão no interior dos poros. A possibilidade da formação de multicamadas no sistema His-Toyopearl foi observada através da isoterma de adsorção (Figura 4.13), a partir de uma concentração de proteína em equilíbrio em torno de 7 mg/mL.

As constantes cinéticas calculadas pelo modelo de Skidmore *et al.*, 1990, estão mostradas na Tabela 4.10, porém nenhuma análise foi realizada visto que o modelo não se ajustou aos dados experimentais. Para a avaliação da cinética de adsorção de IgG nestes sistemas é necessário a aplicação de um modelo mais completo que considere as interações não-específicas entre proteína-proteína e/ou proteína-matriz.

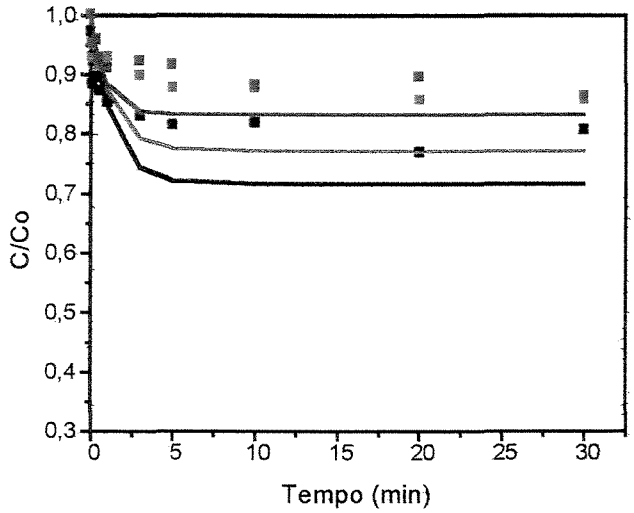


Figura 4.20: Curvas cinéticas e teóricas obtidas para o sistema His-PEVA, à temperatura ambiente, nas concentrações iniciais de 0,26; 3,0 e 7,3 mg/mL Curvas teóricas em linhas e dados experimentais em pontos. Experimentos realizados em tanques agitados (seringas).

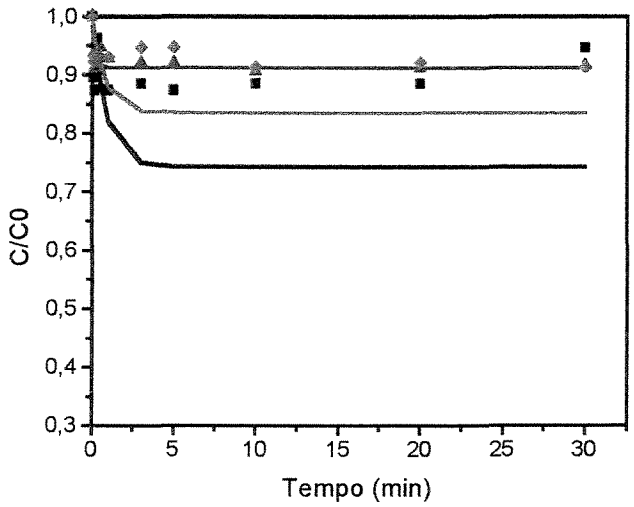


Figura 4.21- Curvas cinéticas e teóricas obtidas para o sistema His-Toyopearl, à temperatura ambiente, nas concentrações iniciais de 0,26; 3,0 e 9,0 mg/mL Curvas teóricas em linhas e dados experimentais em pontos. Experimentos realizados em tanques agitados (seringas).

Tabela 4.10 : Valores das constantes cinéticas de adsorção e dessorção de IgG para os sistemas His-PEVA e His-Toyopearl

	Co (mg/mL)	K_d (mg/mL)	k_a ($mL.mg^{-1}min^{-1}$)	k_d (min^{-1})
His-Toyopearl	0,26	3	0,28 ± 0,14	0,84
	3,0	3	0,21 ± 0,1	0,63
	9,0	3	0,53 ± 0,13	1,6
His-PEVA	0,25	5,64	0,094 ± 0,05	0,53
	3,0	5,64	0,08 ± 0,042	0,45
	7,3	5,64	0,085 ± 0,027	0,48

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS

5.1– Conclusões

Este trabalho avaliou o desempenho de duas matrizes, membranas de PEVA e gel Toyopearl empregando o ligante histidina para a adsorção de imunoglobulina G, em função da densidade de ligantes imobilizados, seletividade, capacidade máxima de adsorção, constante de dissociação e constantes cinéticas de adsorção e dessorção do complexo proteína-ligante.

Inicialmente foi verificado que a IgG podia ser adsorvida em quantidades significativas, tanto no suporte His-PEVA quanto no His-Toyopearl. Porém em relação a adsorção de IgG, o suporte His-PEVA apresentou através de análise eletroforética, um número menor de bandas do que o His-Toyopearl, em ambos tampões testados, representando uma menor adsorção não-específica de outras proteínas presentes no soro humano. Apesar da capacidade de adsorção de ambos suportes, na presença do tampão Hepes pH 7,0, ser superior quando comparada àquela obtida em tampão Tris-HCl pH 7,4, uma maior quantidade de albumina foi adsorvida pelos suportes em tampão de equilíbrio zwiteriônico. A adsorção de albumina não é desejável em uma sessão de tratamento extracorpóreo, pois acarretaria na necessidade de adição de fluidos de reposição ao paciente.

A capacidade de adsorção dos suportes foi avaliada em modo dinâmico e estático, tendo o sistema His-PEVA apresentado uma maior eficiência para adsorção de IgG, por ambos os métodos. Através de experimentos em tanques agitados foram construídas isotermas de adsorção para os suportes derivatizados e não derivatizados, à temperatura ambiente e a 37 °C, que dependendo da forma da curva, permitiram o ajuste dos parâmetros, capacidade máxima e constante de dissociação, do modelo de Langmuir aos

dados experimentais. Nos casos em que os sistemas não apresentaram um comportamento langmuriano, tentou-se ajustar um modelo linear ou um modelo de Langmuir modificado, o qual considera a formação de multicamadas.

As isotermas obtidas mostraram a ocorrência de interações não-específicas de IgG tanto nas membranas de PEVA quanto no gel Toyopearl, para ambas temperaturas. As isotermas obtidas à temperatura ambiente mostraram, respectivamente, para a membrana e para o gel, uma diferença de 30% e 10 %, entre a capacidade do suporte derivatizado e não derivatizado. Este resultado demonstra que a presença do ligante histidina pouco influenciou para a adsorção de IgG. O aumento de temperatura favoreceu a adsorção de proteína em His-PEVA e His-Toyopearl. Como os suportes apresentam um certo caráter hidrofóbico, este resultado foi atribuído ao favorecimento de interações não-específicas do tipo hidrofóbicas. Foi verificado através dos gráficos de Hill, ausência de cooperatividade de interações laterais proteína-proteína para o suporte His-PEVA, em ambas temperaturas analisadas. Entretanto, o suporte His-Toyopearl apresentou à temperatura ambiente, uma cooperatividade positiva, a qual representa a influência de interações laterais não-específicas proteína-proteína ou proteína-adsorvente. Além disso, foi sugerido a formação de multicamadas neste sistema, devido a forma da isoterma em concentrações elevadas de proteína. Em relação à formação do complexo IgG-histidina, obteve-se constantes de dissociação da ordem de 10^{-5}M, em ambos suportes e temperaturas, indicando uma afinidade média para os suportes, característica de ligantes pseudobioespecíficos.

A confirmação da adsorção não-específica de IgG na matriz, foi obtida considerando as etapas de lavagem, eluição e regeneração após ser atingido o equilíbrio. Nestes resultados foi constatado que o suporte His-PEVA adsorveu especificamente uma maior quantidade de proteína do que o His-Toyopearl, apesar do gel apresentar uma densidade de ligantes (μmol/mL) duas vezes maior que a membrana. Foi sugerido que nas membranas os ligantes estão bem distribuídos e acessíveis à proteína e além disso, uma quantidade elevada de ligantes pode ocasionar impedimentos estéricos, favorecendo a formação de multicamadas no sistema.

A determinação das constantes cinéticas, considerando o modelo simplificado de Skidmore *et al.*, 1990, demonstrou que a adsorção de IgG foi mais rápida no sistema His-Toyopearl do que em His-PEVA. Além disto, o suporte His-Toyopearl apresentou maiores

constantes de dessorção, implicando que a proteína pode ser mais facilmente dessorvida deste suporte.

Através destas análises demonstra-se que o sistema His-PEVA apresenta melhores condições para a adsorção de IgG do que o His-Toyopearl. Entretanto, devido a forte influência de interações não-específicas de IgG, na matriz ou no braço espaçador, torna-se difícil a obtenção de parâmetros confiáveis para a escolha e comparação de um sistema mais adequado, sendo necessário a descrição de um modelo mais complexo que possa representar melhor o desempenho destes sistemas.

5.2 – Sugestões para os próximos trabalhos

No desenvolvimento deste trabalho foi verificado que o ligante histidina imobilizado em membranas de PEVA e gel Toyopearl não apresentou eficiência para a remoção de IgG. Devido as diferenças estruturais entre as matrizes empregados foi difícil comparar a adsorção da proteína nestes suportes. Além disso a presença de interações não-específicas dificultou a avaliação da influência do ligante no processo de adsorção. Talvez esses efeitos possam ser minimizados pela utilização de outros métodos de ativação e imobilização do ligante. Como alternativa, o ligante histidina pode ser imobilizada em gel de sepharose através do braço espaçador aminohexil, tal sistema tem sido empregado como alternativo à proteína A e G para a remoção de auto-anticorpos do soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (Nedonchelle *et al.*, 2000). Tendo em vista a necessidade da determinação de parâmetros que possam descrever o desempenho dos sistemas algumas sugestões poderão ser aplicadas para dar continuidade ao desenvolvimento da pesquisa :

- Tendo o sistema His-PEVA apresentado um potencial para a remoção de auto-anticorpos patogênicos presentes em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (Ventura, 2000) e visto que a adsorção de IgG ocorre na matriz e no ligante, em proporções significativas, o desenvolvimento de um modelo mais completo que considere os diferentes tipos de interações envolvidas no processo de adsorção, pode gerar parâmetros que permitam a comparação com outros sistemas convencionalmente utilizados no tratamento extracorpóreo de doenças auto-imunes.

- Uma outra sugestão seria testar outras matrizes mais hidrofílicas e outros ligantes como os biomiméticos, os quais tem demonstrado eficiência para a adsorção de IgG.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, J.D. e HLADY, V. Protein adsorption and materials biocompatibility: a tutorial review and suggested hypothesis. **Advances in Polymer Science**, v.79, p.14-26, 1986.

ANTOZZI, C.; BERTA, E.; CONFALONIERI, P.; ZUFFI, M.; CORNELIO, F. e MANTEGAZZA R. Protein A immunoadsorption in immunosuppression-resistant myastenia gravis. **The Lancet**, v.343, n 8, p.124, Janeiro 1994.

ANSPACH, F.B.; JOHNSTON, A.; WIRTH, H.J.; UNGER, K.K. e HEARN, T.W. High performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. Thermodynamic and kinetic investigations on rigid and soft affinity gels with varying particle and pore sizes. **Journal of Chromatography,** v.476, p.205-225, 1989.

ANSPACH, F.B.; PETSCH, D e DECKWER, W.D. Purification of murine IgG1 on group specific affinity sorbents. **Bioseparation**, v.6, p.165-184, 1996.

ARBISER, J.L.; DZIECZKOWSKI, J.S.; HARMON, J.V. e DUNCAN, L.M. Leukocytoclastic vasculitis following staphylococcal protein A column immunoadsorption therapy. **Archieves Dermatology**, v.131, p.707-709, 1995.

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

Capítulo 6

BAROCCI, S e NOCERA, A. *In vitro* Removal of anti-HLA IgG antibodies from highly sensitized transplant recipients by immunoadsorption with protein A and protein G sepharose columns: a comparison. **Transplant International**, v.6, p.26-33, 1993.

BERTA, E.; CONFALONIERI, P; SIMONCINI, O.; BERNARDI, G.; BUSNACH, G.; MANTEGAZZA, R.; CORNELIO, F. e ANTOZZI C. Removal of antiacetylcholine receptor antibodies by protein A immunoadsorption in myastenia gravis. **The International Journal of Artificial Organs**, v.17, n.11, p. 60-608, 1994.

BEESKOW, T.C.; KUSHARYOTO, W.; ANSPACH, F.B.; KRONER, K.H. e DECKWER, W.D. Surface modification of microporous polyamide membranes with hydroxyethyl cellulose and their application as affinity membranes. **Journal of Chromatography A,** v.715, p.49-65, 1995.

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

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

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

BYGREN P.; FREIBURGHAUS, C.; LINDHOLM, T.; SIMONSEN, O.; THYSELL, H. e WIESLANDER, J. Goodpasture syndrome treated with staphylococcal protein A immunoadsorption. **Lancet**, v.2, n. 8467, p.11295-1296, 1985.

BUENO, S.M.A. **Séparation d'immunoglobulines G à partir du sérum ou du plasma humain en utilisant le ligand L-histidine immobilisé sur des membranes à fibres**

creuses. Compiégne, 1995. Tese (Doutorado) – Université de Technologie de Compiégne, 1995.

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 fiber membranes. **Journal of Chromatography B**, v.667, p. 57-67, 1995A.

BUENO, S.M.A.; HAUPT, K. e VIJAYALAKSHMI, M.A. *In vitro* removal of human IgG by pseudobioespecific affinity membrane filtration on a large scale : a preliminary report. **The International Journal of Artificial Organs**, v.18, n.7, p. 392-398, 1995B.

BUENO, S.M.A.; LEGALLAIS, C.; HAUPT, K. e VIJAYALAKSHMI, M.A. Experimental kinetic aspects of hollow fiber membrane-based pseudobioaffinity filtration: process for IgG separation from human plasma. **Journal of Membrane Science**, v.117, p. 45-46, 1996.

CAHILL, M.R.; MACEY, M.G.; CAVENAGH, J.D. e NEWLAND, A.C., Protein A immunoadsorption in chronic refractory ITP reverses increased platelet activation but fails to achieve sustained clinical benefit. **British Journal of Haematology,** v.100, p.358-364, 1998.

CALICH, V.L.G. e CAPPIVAZ, C.A. **Imunologia básica**. Artes Médicas LTDA, 1ª edição, 1989. 330-355p.

CASTILHO, L.R.; DECKWER, W.D. e ANSPACH, F.B. Influence of matrix activation and polymer coating on the purification of human IgG with protein A affinity membranes. **Journal of Membrane Science,** v.172, p. 269-277, 2000.

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**, v.48, p.415-427, 1995.

Capítulo 6

CHARCOSSET C. Purification of proteins by membrane chromatography. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.71, p.95-110, 1998.

CHASE, H.A. Prediction of the performance of preparative affinity chromatography. **Journal of Chromatography,** v.297, p.179-202, 1984.

CHEVALIER, P.; JAEGER, C.; LEYLAVERGNE, J.; ABRIAL, C. e RULLIERE, R. Manifestations neuro-psychiatriques du lupus. **Le Concours Médical**, v.112, p.3375-3377, 1990.

COWAN, G.H.; GOSLING, I.S. e SWEETENHAM, W.P. Modelling methods to aid the design and optimisation of batch stirred-tank and packed-bed column adsorption and chromatography units. **Journal of Chromatography**, v.484, p.187-210, 1989.

DARNIGE, L.; LEGALLAIS, C.; ARVIEUX, J.; VILCOT, J.R.; PITIOT, O. e VIJAYALAKSHMI, M.A. A funcionalized hollow fiber membranes cartridge (HFC) for adsorption of "anticofactor/antiphospholipid antibodies"(APL): A potencial tool for treatment. **Artificial Organs**, 1999.

ESNAULT, V.L.M.; TESTA, A; JAYNE, D.R.W.; SOULILLON, J.P. e GUENEL J. Influence of immunoadsorption on the removal of immunoglobulin G auto-antibodies in crescentic glomerulonephritis. **Nephronology**., v.65, p.180-184, 1993.

FUDENBERG, H.H.; STITES, D.P.; CALDWELL, J.L. e WELL, I.V. **Imunologia básica e clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2ª edição, 1980. 307-315 e 420-426p.

FUGLISTALLER, P. Comparison of immunoglobulin binding capacities and ligand leakage using eight different protein A affinity chromatography matrices. **Journal of Immunological Methods**, v.124, p. 171-177, 1989.

Capítulo 6

GILL, D.S.; ROUSH, D.J. e WILLSON, R.C. Adsorption heterogeneity and thermodynamic driving forces in anion exchange equilibria of cytochrome b_5 . **Journal of Colloid and Interface Science**, v.167, p.1-7, 1994.

HABIB, R.E.; COULET, P.R.; SANHADJI, K.; GAUTHERON, D.C.; LAVILLE, M. e TRAEGER, J. DNA immobilized onto an acyl-Azide derivative of collagen membranes for use as immunoadsorbent. **Biotechnology and Bioengineering**, v.26, p.665-669, 1984.

HAUPT, K. **Interaction des protéines avec L-histidine immobilisé sur de suports solides.** Compiégne, 1994. Tese (Doutorado) – Université de Technologie de Compiégne, 1994.

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

HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K. e SMITH, P.K. **Immobilized affinity ligand techniques**. Califórnia: Academic Press, INC., 1992. 31-32p.

HERMANSON, G.T.; MATTSON, G.R. e KROHN, R.I. Preparation and use of immunoglobulin-binding affinity supports on emphaze beads. **Journal of Chromatography A**, v.691, p.113-122, 1995.

HILL, C.G. **An introduction to chemical engineering kinetics & reactor design**. Nova York: John Wiley & Sons, 1997. 167-173p.

HIRAI, K.; KINARA, M.; NAKAJIMA, F.; MIYANOMAE, Y. e YOSHIOKA, H. Immunoadsorption therapy in guillain-barré syndrome. **Pediatric Neurology**, v.19, n.1, p.55 -57, 1998.

Capítulo 6

HORSTMANN, B.J.; KENNEY, C.N. e CHASE, H.A. Adsorption of proteins on sepharose affinity adsorbents of varying particle size. **Journal of Chromatography**, v.361, p.179-190, 1986.

HORSTMANN, B..J. e CHASE, H.A. Modelling the affinity adsorption of immunoglobulin G to protein A immobilized to agarose matrices. **Chemical Engineering Research Design**, v.67, p.243-254, 1989.

HOSOKAWA, S. e OYAMAGUCHI. A. Safety, stability and effectiveness of immunoadsorpotion under membrane plasmapheresis treatment for miastenia gravis. **Asaio Transactions**, v.36, n.3, p.M207-M208, 1990.

HOU, K.C. e HOU, C.J. Immobilization of protein G on nylon membrane for the removal of IgG form human plasma. **Abstracts of Paper of the American Chemical Society**, v.198, n.10, p.146, 1989.

IKONOMOV, V.; SAMTLEBEN, W.; SCHMIDT, B.; BLUMENSTEIN, M. e GURLAND, H.J. Adsorption profile of commercially available adsorbents: an *in Vitro* evaluation. **The International Journal of Artificial Organs**, v.15, n.5, p. 312-319, 1992.

JIA, L.; YANG, L.; ZOU, H.; ZHANG, Y.; ZHAO, J.; FAN, C. e SHA, L. Protein A tangencial flow affinity membrane cartridge for extracorporeal immunoadsorption therapy. **Biomedical Chromatography,** v.13, p.473-477, 1999.

JONES, J.V.; ROBINSON, M.F.; PARCIANY, R.K.; LAYFER, L.F. e McLEOD, B. Therapeutic plasmapheresis in systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rhematism,** v.24, n.9, p.1113-1120, Setembro 1981.

KABISCH, A; KROLL, H.; WEDI, B.; KIEFEL, V.; PRALLE, H. e ECKHARDT, C.M. Severe adverse effects of protein A immunoadsorption. **The Lancet**, v.343, n.8, p.116, Janeiro 1994.

Capítulo 6

KIM, M.; SAITO, F. e FURUSAKI, S. Protein adsorption capacity of a porous phenylalanine containing membrane based on a polyethylene matrix. **Journal of Chromatography**, v. 586, p. 27-33, 1991.

KINOSHITA, M.; AOTSUKA, S.; FUNAHASHI, T.; TANI, N. e YOKOHARI, R. Selective removal of anti-double-strandedDNA antibodies by immunoadsorption with dextran sulphate in a patient with systemic lupus erythematosus. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.48, p. 856-860, 1989.

KLEIN, E. **Affinity membranes – their chemistry and performance in adsorptive separation process.** New York: John Wiley & Sons, INC., 1991. 15-25p.

KLEIN, E.; EICHHOLZ, E.; THEIMER, F. e YEAGER, D. Affinity membranes prepared form hydrophilic coatings on microporous polysulfone hollow fibers. **Journal of Membrane Science,** v.90, p.69-80, 1994A.

KLEIN, E.; EICHHOLZ, E.; THEIMER, F. e YEAGER, D. Chitosan modified sulfonated poly (ethersulfone) as a support for affinity separations. **Journal of Membrane Science**, v.95, p.199-204, 1994B.

KLEIN, E.; YEAGER, D.; SESHADRI, R. e BAURMEISTER, U. Affinity adsorption devices prepared form microporous poly(amide) hollow fibers and sheet membranes. **Journal of Membrane Science**, v.129, p.31-46, 1997.

KOCHAN, J.E.; WU, Y.J. e ETZEL, M.R. Purification of bovine immunoglobulin G via protein G affinity membranes. **Industrial & Engineering Chemical Research**, v.35, p.1150-1155, 1996.

LABROU, N. e CLONIS, Y.D. The affinity technology in downstream processing. **Journal of Biotechnology**, v.36, p.95-119, 1994.

Capítulo 6

LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids, **Journal of American Chemical Society**, v.38, p.2267-2295, 1916.

LANGMUIR, I. The Adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. **Journal of American Chemical Society,** v.40, p.1361-1403, 1918.

LANGONE, J.J. Use of protein A in quantitative immunochemical analysis of antigens and antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v.51, p.3-22, 1982.

LINDMARK, R.; THORÉN-TOLLING, K. e SJÖQUIST, J. Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. **Journal of Immunological Methods**, v.62, p.1-13, 1983.

LUCENA, S.L. **Modelagem e simulação da separação das proteínas α-lactoalbumina e β-lactoglobulina por cromatografia preparativa em resinas trocadoras de ânios utilizando leito móvel simulado**. Campinas: FEQ, UNICAMP, 1999. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. p.47.

LUO, Q e ANDRADE, J.D. Cooperative adsorption of proteins onto hydroxyapatite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.200, p.104-113, 1998.

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

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

MARAN, R.; DUEYMES, M.; LE CORRE, R.; RENAUDINEAU, Y.; SHOENFELD, Y. e YOUINOU, P. IgG subclasses of human auto-antibodies. **Annals Medicine Interne**, v.148, n.1, p.29-38, 1997.

MASTRANGELO, F.; PRETAGOSTINI, R.; BERLOCO, P.; POLI, L.; CINTI, P.; PATRUNO, P.; ALFONSO, L.; POMPEI, L.; CARBONI, F.; RIZZELLI, S.; ALFANI, D. e CORTESINI, R. Immunoadsorption with protein A in humoral acute rejection of kidney transplants: multicenter experience. **Transplantation Proceedings**, v.27, n.1, p.892-895, Fevereiro 1995.

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

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A. e RODWELL, V.W. **Harper's biochemistry**. Appleton & Lange, 3ª edição, 1993. 665-676p.

NEDONCHELLE, E.; PITIOT, O. e VIJAYALAKSMI, M.A. A preliminary study for isolation of catalytic antibodies by histidine ligand affinity chrmatography as na alternative to convencional protein A/G methods. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.83, n.1-3, p.287-294, Janeiro-Março 2000.

OLIVARI, M.T.; MAY, C.B.; JOHNSON, N.A; RING, W.S. e STEPHENS, M.K. Treatment of acute vascular rejection with immunoadsorption. **Circulation**, v.90, n.5, p.70-73, Novembro 1994.

PALMER A.; GJORSTRUP, P.; SEVERN, A; WELSH, K. e TAUBE, D. Treatment of systemic lupus erythematosus by extracorporeal immunoadsorption. **The Lancet**, v.30, p.272, 1988.

PERSSON, N.H.; BUCIN, D.; EKBERG, H.; KÄLLÉN, R; PERSSON, M.O; SIMANAITIS, G.; STERNER, G. e SWEDENBORG, P. Immunoadsorption in acute

vascular rejection after renal transplantation. **Tranplantation Proceedings,** v.27, n.6, p.3466, Dezembro 1995.

REVILLARD, J.P. **Immunologie**. Bruxelas: De Boeck-Wesmael S.A., 1994. 34p.

RUIZ, J.C.; FRANCISCO, A.L.M.; PRADA, J.A.V.; RUANO, J.; PASTOR, J.M.; ALCALDE, G. e ARIAS, M. Successful heart transplantation after anti-HLA antibody removal with protein A immunoadsorption in a hyperimmunized patient. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, p.1366-1367, Maio1994. (letters).

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

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

SINGER, D.R.J.; ROBERTS, R. e COHEN, J. Infective complications of plasma exchange: a prospective study. **Arthritis and Rheumatism**, v.30, n.4, p.443-447, Abril 1987.

SKIDMORE, G.L.; HORSTMAN, B.J e CHASE, H.A. Modelling single-component protein adsorption to the cation exchanger s sepharose FF. **Journal of Chromatography**, v.498, p.113-128, 1990.

SRIDHAR P. Design of affinity membrane bioseparations. **Chemical Engeneering Technology**, v.19, p.398-404,1996.

STITES, D.P. e TERR, A.I. **Imunologia básica**. Rio de Janeiro: Prenctice/Hall do Brasil, 1992. 85-94p.

Capítulo 6

SUEN, S. e ETZEL M. A mathematical analysis of affinity membrane bioseparations. **Chemical Engineering Science**, v.47, n.6, p.1355-1364, 1992.

SULTAN, Y.; BUSSEL, A; MAISONNEUVE, P.; POUPENEY, M.; SITTY, X. e GAJDOS, P. Potencial danger of thrombosis after plasma exchange in the treatment of patients with immune disease. **Transfusion**, v.19, n.5, p.589, 1979.

SUNDBERG, L. e PORATH, J. Preparation of adsorbents for bioespecific affinity chromatography. **Journal of Chromatography**, v.90, p.87-98, 1974.

SUZUKI, K.; HARA, M.; HARIGAI, M.; ISHIZUKA, T.; HIROSE, T.; MATSUKI, Y.; KAWAGUCHI, Y.; KITANI, A; KAWAGOE, M. e NAKAMURA, H. Continuous removal of anti-DNA antibody, using a new extracorporeal immunoadsorption system, in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v.34, n.12, p.1546-1552, December 1991.

TAGAWA,Y.; YUKI, N. e HIRATA, K. Ability to remove immunoglobulins and anti-ganglioside antibodies by plasma exchange. **Journal of Neurological Sciences**, v.157, p.90-95, 1998.

TENG, S.F.; SPROULE, K.; HUSAIN, A. e LOWE, C.R.Affinity chromatography on immobilized "biomimetic" ligands synthesis, immobilization and chromatography assessment of an immunoglobulin G-binding ligand. **Journal of Chromatography B**, v.740, p.1-15, 2000.

TERMAN, D.S.; STEWART, I.; ROBINETTE, J.; CARR, R. e HARBECK, R. Specific removal of DNA antibodies *in vivo* an extracorporeal immunoadsorbent. **Clinical Experimental Immunology**, v.24, p.231-237, 1976.

Capítulo 6

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

TERMAN, D.S.; BUFFALOE, G.; COOK, G.; SULLIVAN, M.; MATTIOLI, C.; TILLQUIST, R. e AYUS, J.C. Extracorporeal immunoadsorption: inicial experience in human systemic lupus erythematosus. The **Lancet**, v.20, p.824-826, Outubro 1979.

UNASKA M.; DAVIES, P.A; ESNOUF, M.P. e BELLHOUSE, B.J. Comparative study of reaction kinetics in membrane and agarose bead affinity systems, **Journal of Chromatography**, v.519, p.53-67, 1990.

VENTURA, R.C.A. **Remoção de auto-anticorpos de amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes empregando filtração em membranas de afinidade.** Campinas: FEQ, UNICAMP, 2000. Tese (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2000.

VIJAYALAKASHMI, M.A. Pseudobioespecific ligand affinity chromatography. **Trends in Biotechnology**, v.7, n.3, p.2-7, 1989.

WEISSENBORN, M.; HUTTER, B.; SINGH, M.; BEESKOW, T.C. e ANSPACH, F.B. A study of combined filtration and adsorption on nylon-based dye-affinity membranes: separation of recombinant L-alanine dehidrogenase from crude fermentation broth. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v.25, p.159-168, 1997.

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

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

ANEXO A

A seguir estão apresentados os gráficos de Scatchard equivalentes a linearização da equação do modelo de Langmuir, para os dados experimentais do gel Toyopearl e da membrana de PEVA, derivatizados e não derivatizados, à temperatura ambiente e à 37 °C.

Gráficos referentes aos experimentos realizados à temperatura ambiente, para os suportes derivatizados e não derivatizados

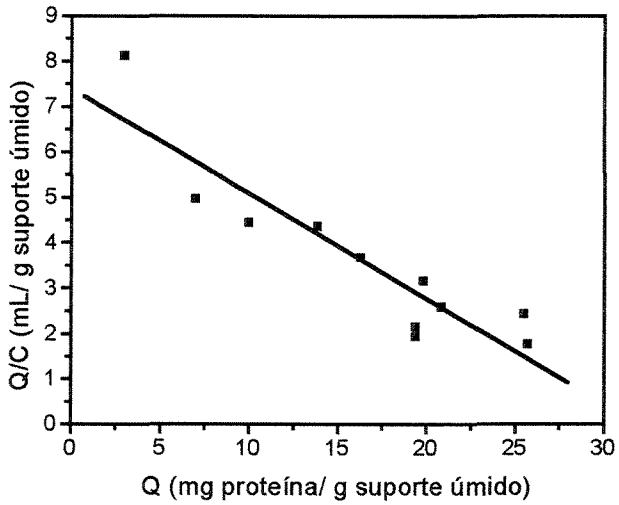


Figura A1 :Análise de Scatchard, à temperatura ambiente, para o suporte His-Toyopearl (■) , r = 0,91 , utilizando o tampão Hepes 25 mM pH 7,0. Referente ao gráfico da Figura 4.8.

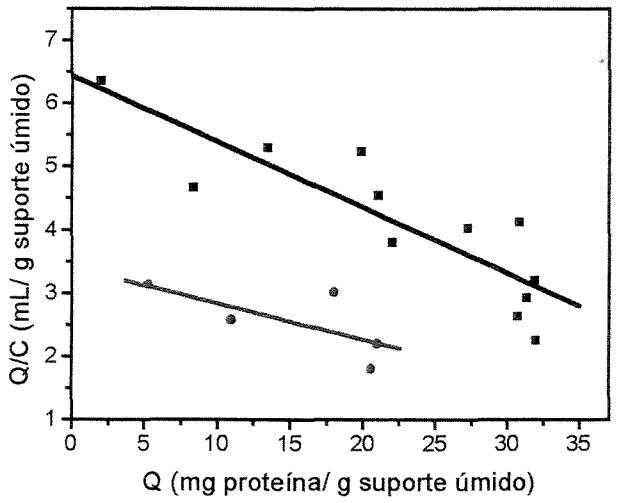


Figura A2: Análise de Scatchard, à temperatura ambiente, para o suporte His-PEVA (■) , r= 0,86 , e para a membrana de PEVA(■), r = 0,7 , utilizando o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4. Referente ao gráfico da Figura 4.12.

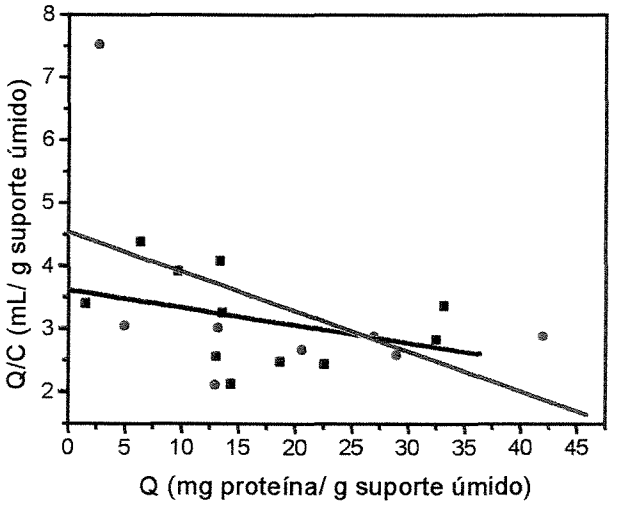


Figura A3: Análise de Scatchard, à temperatura ambiente, para o suporte His-Toyopearl (■) , r = 0,37 , e para o gel Toyopearl (■), r= 0,48, utilizando o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4. Referente ao gráfico da Figura 4.13 (inclui todos os pontos experimentais)

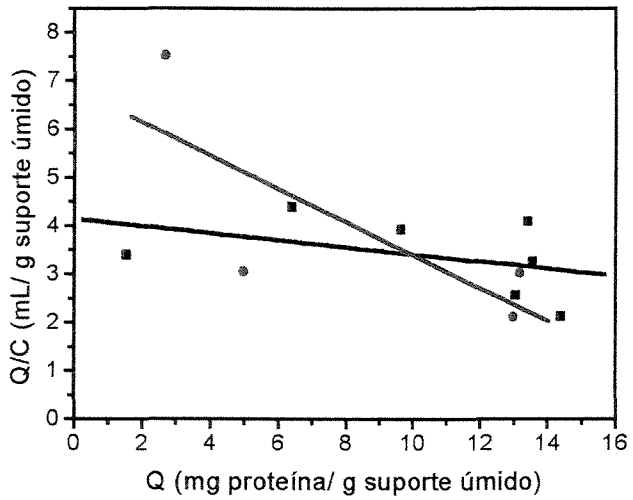


Figura A4: Análise de Scatchard, à temperatura ambiente, para o suporte His-Toyopearl (■) , r= 0,45, e para o gel Toyopearl (■), r= 0,7, utilizando o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4. Referente ao gráfico da Figura 4.14

Gráficos referentes aos experimentos realizados à temperatura de 37 °C, para os suportes derivatizados e não derivatizados

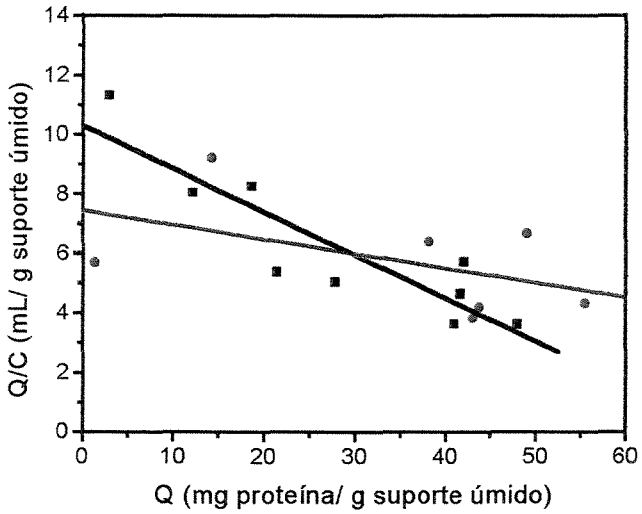


Figura A5: Análise de Scatchard, à temperatura de 37 °C, para o suporte His-PEVA (■) , r = 0,88 , e para a membrana de PEVA (●), r= 0,5, uilizando o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4. Referente ao gráfico da Figura 4.15

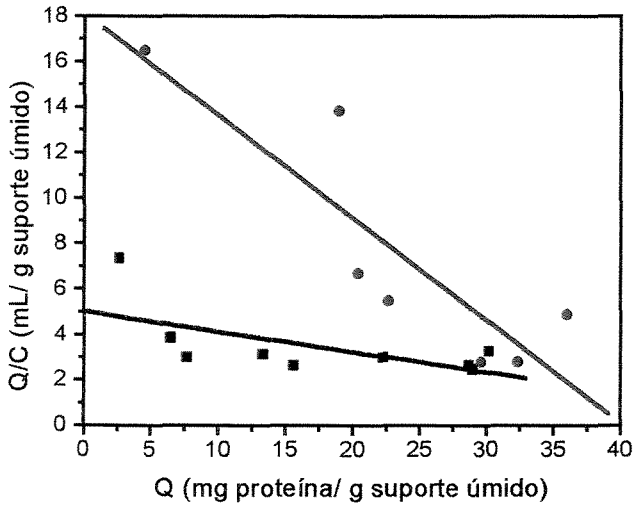


Figura A6: Análise de Scatchard, à temperatura de 37 °C, para o suporte His-Toyopearl (■), r = 0,62, e para o gel Toyopearl (●), r= 0,86, utilizando o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4. Referente ao gráfico da Figura 4.16.

ANEXO B

Nas Figuras seguintes estão apresentados os gráficos de Hill, para os suportes His-PEVA e His-Toyopearl, à temperatura ambiente e à 37 °C, obtidos a partir da equação transformada de Langmuir, expressa como :

$$\mathbf{Ln(Q/L) = LnK_a + nLnC}$$

Onde L é a concentração de ligante livre em equilíbrio, calculada da diferença entre a capacidade máxima e a quantidade de proteína adsorvida para cada concentração inicial ($Q_m - Q$), C é a concentração de proteína em equilíbrio no sobrenadante, n é o coeficiente de cooperatividade e K_a é a constante de associação ($1/K_d$).

A análise dos gráficos é baseada nos valores obtidos para o coeficiente de cooperatividade (coeficiente angular da reta) que segue as seguintes hipóteses (Luo e Andrade, 1998):

Se n=1 significa que não há cooperatividade de interação protéica

Se n>1 significa uma cooperatividade positiva, caracterizada por interações laterais atrativas do tipo proteína-proteína ou proteína-adsorvente.

Se n<1, significa cooperatividade negativa, caracterizada por interações laterais repulsivas do tipo proteína-proteína ou proteína-adsorvente.

Gráficos referentes aos experimentos realizados à temperatura ambiente, para os suportes derivatizados.

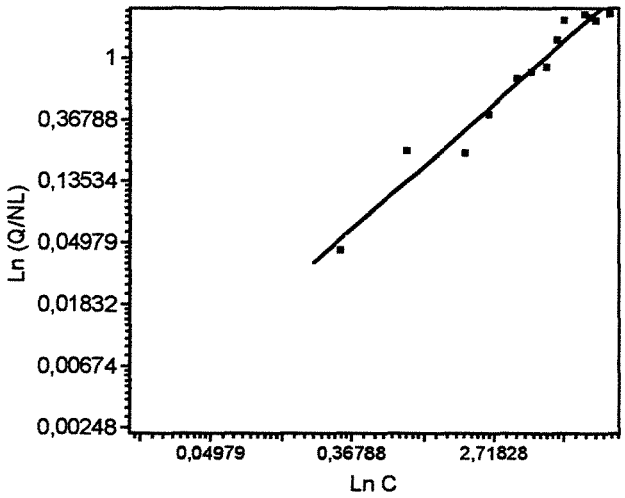


Figura B1: Gráfico de Hill obtido, à temperatura ambiente, para o suporte His-PEVA, utilizando o tampão Tris-HCl pH 7,4, com valor de n= 1 ± 0,06. Referente à isoterma para His-PEVA da Figura 4.12.

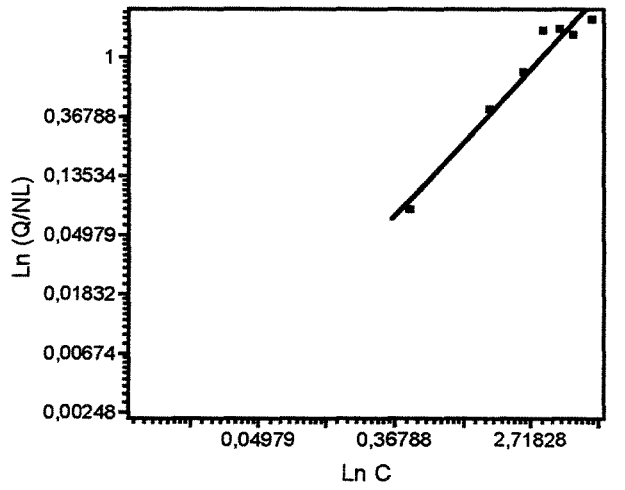


Figura B2: Gráfico de Hill obtido, à temperatura ambiente, para o suporte His-Toyopearl utilizando o tampão Tris-HCl pH 7,4, com valor de n= 1,23 ± 0,12. Referente à isoterma para His-Toyopearl da Figura 4.14.

Gráficos referentes aos experimentos realizados à temperatura de 37 °C, para o suporte His-PEVA.

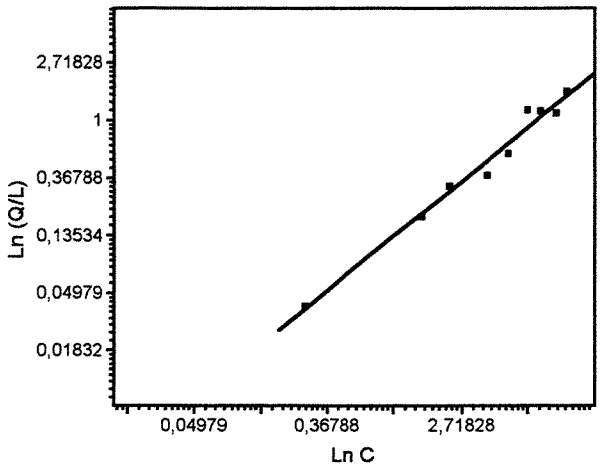


Figura B3: Gráfico de Hill obtido, à temperatura de 37 °C, para o suporte His-PEVA, utilizando o tampão Tris-HCl pH 7,4, com valor de n= 0,94 ± 0,05. Referente à isoterma para His-PEVA da Figura 4.15.