CLAUDIA IWASHITA VERINAUD

**DESENVOLVIMENTO DE DUAS ESTRATÉGIAS DE
PURIFICAÇÃO DE IgM A PARTIR DE PLASMA HUMANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2016

CLAUDIA IWASHITA VERINAUD

**DESENVOLVIMENTO DE DUAS ESTRATÉGIAS DE
PURIFICAÇÃO DE IgM A PARTIR DE PLASMA HUMANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Elisabeth Cheng

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Verinaud, Claudia Iwashita.

Desenvolvimento de duas estratégias de purificação de IgM a partir de plasma humano / Claudia Iwashita Verinaud. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Elisabeth Cheng.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Purificação de proteínas do plasma por cromatografia líquida.

Versão do título para o inglês: Development of two strategies for the purification of human plasma IgM.

1. Hemoderivados 2. Imunoglobulinas 3. IgM 4. Cromatografia líquida I. Cheng, Elisabeth II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0104/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Claudia Iwashita Verinaud

Título da Tese: Desenvolvimento de duas estratégias de purificação de IgM a partir de plasma humano.

Orientador(a): Elisabeth Cheng.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 13 de setembro de 2012.

Protocolo: I-959/12

Dra. Elisabeth Cheng
Centro de Biotecnologia
Instituto Butantan

Referente Projeto: "Purificação de IgM e proteínas do complexo protrombínico a partir de plasma humano por cromatografia líquida e avaliação de novos métodos analíticos para controles de processos e caracterização dos concentrados".

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) informa que o projeto acima referido é isento de análise por parte desta Comissão, pois não faz uso de animais vertebrados em sua execução.

Cordialmente,

Dr. Marcelo Larami Santoro
Coordenador da CEUAIB

*À todos aqueles que um dia se beneficiarão das
pesquisas realizadas com Hemoderivados.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por guiar meu caminho a todo momento e por permitir meu crescimento profissional e pessoal.

Ao programa de **Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT**, em nome da coordenadora do curso **Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli**, pela oportunidade de desenvolver o doutorado por este programa.

À minha orientadora **Dra Elisabeth Cheng**, a quem devo muito pela confiança depositada, por acreditar que eu poderia concluir o doutorado e pelos inúmeros ensinamentos diários no laboratório, fazendo parte do meu crescimento profissional e pessoal.

À **Dra Elizabeth Angelica Martins Leme**, por acreditar na minha contribuição à área de Hemoderivados do Instituto Butantan, pelos ensinamentos diários e por transmitir uma vontade de trabalhar que vai além do simples experimento.

Ao **Dr Alexandre Yague Lopes**, pelas discussões e conselhos do trabalho no laboratório.

À **Dra Anita Mítico Tanaka-Azevedo**, por ter me incentivado a continuar os estudos após o término do mestrado, além do incentivo em buscar uma melhor qualidade de vida.

À todos os **pesquisadores** do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan por disponibilizarem o espaço físico e os equipamentos, pelos ensinamentos em aulas e seminários.

Aos membros da banca de qualificação: **Dra Mickie Takagi, Dra Giovana Cappio Barazzone e Dr Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin** pela participação e pelas sugestões na qualificação.

Ao meu marido **Michel de Abreu Verinaud**, por tanto amor, carinho, paciência, por ser meu maior incentivador a buscar o melhor para minha vida.

À minha mãe **Maria Kato**, que sempre me incentivou a encarar o doutorado como um aprendizado não somente intelectual, mas um aprendizado para a vida.

À **Dra Emiko Clarice Okamoto**, por sempre me fazer acreditar na realização dos meus objetivos com pensamentos positivos.

À **Erika Nakajima**, pela amizade, convívio, incentivo e por sempre estar disposta a ajudar.

À **Flávia Cristina Braga** por ter me ajudado com os experimentos durante o período do seu estágio de iniciação científica.

Aos amigos e colegas de trabalho **Juliano Ventura, Daniela Jinzenji e Gabriel Pinna Feliciano**, que fizeram parte da minha trajetória no doutorado.

Aos alunos que passaram pelo laboratório nesse período e que fizeram parte do convívio diário: **Vinícius Nakao, André Conti, Iuri Reino Mariano, Marina Yukari Kubota, Camila Oliveira Carneiro, André Guerra**.

À **todos os funcionários** do Centro de Biotecnologia que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, principalmente **Sueli, Mercia, Ronaldo, e Joselino**.

Aos funcionários da secretaria do Programa Interunidades em Biotecnologia, **Marcos, Fábria e Eliane** por todo serviço prestado durante o doutorado.

À bibliotecária **Tereza**, da biblioteca do ICB-USP, que fez a revisão do trabalho seguindo a normalização técnica, e foi tão atenciosa e prestativa.

“A sabedoria não se transmite, é preciso que nós a descubramos fazendo uma caminhada que ninguém pode fazer em nosso lugar e que ninguém nos pode evitar, porque a sabedoria é uma maneira de ver as coisas.”

(Marcel Proust)

“Nada na vida se perde. Quando erramos, adquirimos aprendizado, quando corrigimos um erro, adquirimos conhecimento, e, quando ajudamos alguém a corrigir um erro, demonstramos ter adquirido sabedoria.”

(Rafael Monteiro)

RESUMO

VERINAUD, C. I. **Desenvolvimento de duas estratégias de purificação de IgM a partir de plasma humano**. 2016. 153 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Neste trabalho foram estudadas 2 estratégias visando a purificação de IgM a partir de plasma humano. A primeira estratégia baseou-se em um processo desenhado para a fábrica de produção de hemoderivados do Instituto Butantan, que visava a produção dos fatores de coagulação VIII e IX, albumina e IgG. Na primeira etapa do processo, a coluna de gel filtração Sepharose 4FF, são coletadas 4 grandes frações, das quais a primeira e a terceira continuam na linha de produção. A partir da fração 2, não utilizada no processo, 64% de IgM foi recuperada, com fator de purificação de 8 vezes. Esta fração contém ainda 12% de IgG, 18% de IgA e praticamente nenhuma albumina, além de outras proteínas contaminantes. Para a segunda etapa de purificação foram testadas as resinas de troca iônica: ANX Sepharose FF, Q Sepharose FF, coluna monolítica QA e a membrana Sartobind Q. Em todas as colunas foi possível aumentar a pureza da IgM e obter uma boa separação entre IgG e IgM. Na coluna Q Sepharose FF 55% da IgM foi recuperada com fator de purificação de 6 vezes e na coluna ANX Sepharose FF 70%, com fator de purificação de 5 vezes. Após 2 colunas cromatográficas, a IgM foi separada das 2 proteínas mais abundantes do plasma, a albumina e a IgG e o enriquecimento da IgM em relação a IgA e IgG foi bastante satisfatória. Para aumentar a pureza de imunoglobulinas totais em relação a outras proteínas contaminantes, foi testada a utilização de uma coluna de afinidade a metal IMAC-Co²⁺, mas esta coluna não foi eficiente. A segunda estratégia faz parte de um processo de fracionamento de plasma em desenvolvimento em nosso laboratório. A purificação do plasma inicia-se com a separação dos fatores de coagulação na coluna ANX Sepharose FF. Mais de 99% das proteínas presentes no plasma não são adsorvidas à coluna, resultando em um plasma empobrecido de fatores de coagulação que é a amostra usada para iniciar a purificação de IgM. Um estudo sistemático na coluna Q Sepharose FF, envolvendo gradiente de pH e salino, para a eluição das proteínas da coluna, resultou em um método em que obtivemos uma fração contendo IgG e uma contendo albumina, com pureza maior que 90%, além de uma terceira contendo IgM e outras proteínas contaminantes. A recuperação de IgM foi de 87% e o fator de purificação 7 vezes. A purificação do eluato da Q Sepharose FF na coluna de gel filtração Sephacryl S300, levou à separação de IgM de proteínas de menor massa molecular, mas não à homogeneidade. Os resultados obtidos indicam que a IgM pode ser purificada com sucesso empregando ambas as estratégias. Não há ainda uma legislação definida da pureza necessária para que esta imunoglobulina possa ser empregada comercialmente.

Palavras-chave: Hemoderivados. Imunoglobulinas. IgM. Cromatografia líquida.

ABSTRACT

VERINAUD, C. I. **Development of two strategies for the purification of human plasma IgM.** 2016. 153 p. Ph. D. Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

In this work we studied two strategies for the purification of human plasma IgM. The first strategy was based on a process designed for the hemoderivatives production factory of the Butantan Institute to produce coagulation factors VIII and IX, albumin and IgG. On the first step of the process, the gel filtration column Sepharose 4FF, 4 large fractions are collected, where the first and the third continue on the production line. From the second fraction, which is not used in the process, 64% of IgM was recovered with a purification factor of 8. This fraction contains also 12% of IgG, 18% of IgA, near no albumin, and also other contaminating proteins. For the second step of the purification, the ANX Sepharose FF, Q Sepharose FF, Monolithic column QA and Sartobind Q membrane were tested. Separation of IgM from IgG was achieved with all 4 columns as well as an increase of the IgM purity. Using the Q Sepharose FF column, 55% IgM was recovered with a purification factor was 6 and using the ANX Sepharose FF, 70% was recovered with a purification factor of 5. After 2 chromatographic columns, IgM was separated from the two most abundant proteins, that is albumin and IgG, and the enrichment of IgM in relation to IgG and IgA was very satisfactory. In order to increase the purity of total immunoglobulins in relation to other contaminating proteins, we tested the metal affinity column IMAC-Co²⁺, but the separation was not efficient. The second strategy is part of a plasma fractionation process under development in our laboratory. Plasma purification starts with the separation of coagulation factors on the ANX Sepharose FF column. More than 99% of the plasma proteins are not adsorbed to the column and the resulting coagulation factors depleted plasma is the starting sample used for the IgM purification. A systematic study on a Q Sepharose FF column, involving elutions with pH and salt gradient, was carried out. In the resulting method we collect a fraction containing IgG and another containing albumin, being both with purity higher than 90%, and a third fraction containing IgM and other contaminating proteins. A IgM recovery was 87% and a purification factor of 7. The purification of Q Sepharose FF eluate on the gel filtration column Sephacryl S300 separated IgM from lower molecular mass proteins, but do not lead to homogeneity. Our results indicate that IgM can be successfully purified by both strategies. There is still no defined legislation of the required purity for this immunoglobulin to be commercially used.

Keywords: Hemoderivatives. Immunoglobulins. IgM. Liquid chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma geral do processo de purificação de Hemoderivados do Instituto Butantan.	24
Figura 2 – Taxa de doação de sangue por mil habitantes em diferentes países do mundo.	27
Figura 3 – Perfil de doação de sangue no Brasil, entre 2012 e 2014.....	28
Figura 4 – Empresas líderes em fracionamento de plasma (perfil anterior à compra da Talecris pela Grifols.....	29
Figura 5 – Consolidação das maiores indústrias de fracionamento de plasma do mundo entre 1999 a 2011.	30
Figura 6 – O mercado de hemoderivados no mundo entre 2003 e 2008.	30
Figura 7 - Fracionamento de plasma utilizando método de Cohn.	35
Figura 8 - Exemplo de um desenho de fracionamento de plasma que emprega método de Cohn e cromatografia líquida (BURNOUF, 2007, adaptado por CHENG, 2016).	36
Figura 9 - Ativação da resina e imobilização do metal.	40
Figura 10 - Estrutura básica simplificada de imunoglobulina G.....	42
Figura 11 - Estrutura pentamérica da imunoglobulina M.....	44
Figura 12 – Fluxograma geral da Estratégia 1, utilizada para purificação de IgM.	52
Figura 13 – Fluxograma geral da Estratégia 2, utilizada para purificação de IgM.	57
Figura 14 - Cromatograma da purificação de plasma em coluna Sepharose 4FF. ...	65
Figura 15 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras dos tubos obtidos na purificação de plasma em Sepharose 4FF.	68
Figura 16 - Análise da presença de IgM nos tubos obtidos na purificação de plasma em Sepharose 4FF por western blot.	68
Figura 17 - Análise da presença de IgG nos tubos obtidos na purificação de plasma em Sepharose 4FF por western blot.	68
Figura 18 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA nas frações obtidas na purificação de plasma em Sepharose 4FF por western blot.....	71
Figura 19 – Cromatograma da purificação da Fração 2/4FF em Q Sepharose FF, com eluição em gradiente linear.....	72

Figura 20 - Análise da presença de IgM nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF em Q Sepharose FF, com eluição em gradiente linear.	73
Figura 21 - Cromatograma da purificação da Fração 2/ 4FF em Q Sepharose FF. ...	74
Figura 22 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA das frações obtidas na purificação de IgM em Q Sepharose FF..	75
Figura 23 - Cromatograma da purificação da Fração 2/4FF em QA Monolito.	77
Figura 24 - Gel de poliacrilamida 12 % em condições redutoras (A) e análise da presença de IgM (B) e IgG (C) nas frações obtidas na purificação de IgM em coluna monolítica QA.....	78
Figura 25 - Cromatograma da purificação da Fração 2/4FF em membrana Sartobind Q Nano.....	80
Figura 26 - Gel de poliacrilamida 12 % em condições redutoras (A) e análise da presença de IgM (B) e IgG (C) nas frações obtidas na purificação de IgM em membrana Sartobind Q Nano.....	81
Figura 27 - Cromatograma da purificação da Fração 2/ 4FF em ANX Sepharose FF - 109,6 mg de proteína.	83
Figura 28 - Gel de poliacrilamida 12 % em condições redutoras (A) e análise da presença de IgM (B), IgG (C) e IgA (D) nas frações obtidas na purificação da Fração 2 em ANX Sepharose FF- 109,6 mg de proteína.	83
Figura 29 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA das frações obtidas na purificação de IgM em ANX Sepharose FF - 109,6 mg de proteína.	86
Figura 30 - Cromatograma da purificação da Fração 2/ 4FF, em ANX Sepharose FF – aplicação de 460 mg.	87
Figura 31- Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA das frações obtidas na purificação de IgM em ANX Sepharose FF – aplicação de 460 mg.	90
Figura 32 - Cromatograma da purificação do eluato da coluna ANX Sepharose FF, em IMAC-Co ²⁺ , em pH 7,1.	92
Figura 33 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA das frações obtidas na purificação do eluato da coluna ANX Sepharose FF em IMAC-Co ²⁺ , em pH 7,1.....	94
Figura 34 - Cromatograma da purificação do eluato da coluna Q Sepharose FF, em IMAC-Co ²⁺ , em pH 8,0.	95

Figura 35 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM e IgG das frações obtidas na purificação do eluato da coluna Q Sepharose FF em IMAC-Co ²⁺ , em pH 8,0.	97
Figura 36 - Cromatograma da purificação do eluato da coluna ANX Sepharose FF, em IMAC-Co ²⁺ , em pH 6,0.	98
Figura 37 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM e IgG das frações obtidas na purificação do eluato da coluna Q Sepharose FF em IMAC-Co ²⁺ , em pH 6,0.	99
Figura 38 - Cromatograma da purificação da Fração 2/ 4 FF em IMAC-Co ²⁺ , em pH 7,1.	101
Figura 39 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM e IgG das frações obtidas na purificação da Fração 2/ 4FF em IMAC-Co ²⁺ , em pH 7,1.	102
Figura 40 - Gel de poliacrilamida 12 % e western blot para detecção de IgM nos lotes de IgG produzidos na planta piloto de Hemoderivados do Instituto Butantan.	104
Figura 41 – Cromatograma da purificação de plasma na coluna ANX Sepharose FF.	108
Figura 42 – Cromatograma do Experimento 1.	110
Figura 43 – Proteína total nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 1.	111
Figura 44 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA nas frações obtidas na purificação em Q Sepharose FF – Experimento 1.	112
Figura 45 – Cromatograma do Experimento 2.	113
Figura 46 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA nas frações obtidas na purificação em Q Sepharose FF – Experimento 2.	114
Figura 47 – Cromatograma do Experimento 3.	116
Figura 48 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA nas frações obtidas na purificação em Q Sepharose FF – Experimento 3.	117
Figura 49 – Cromatograma do Experimento 4.	118
Figura 50 – Proteína total nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 4.	120

Figura 51 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA nas frações obtidas na purificação em Q Sepharose FF – Experimento 4.	121
Figura 52 – Cromatograma do Experimento 5.	123
Figura 53 – Proteína total nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 5.	124
Figura 54 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA nas frações obtidas na purificação em Q Sepharose FF – Experimento 5.	125
Figura 55 – Cromatograma do Experimento 6.	126
Figura 56 - Proteína total nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 6.	127
Figura 57 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA nas frações obtidas na purificação em Q Sepharose FF – Experimento 6.	128
Figura 58 – Cromatograma do Experimento 7.	131
Figura 59 – Proteína total nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 7.	131
Figura 60 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA nas frações obtidas na purificação em Q Sepharose FF – Experimento 7.	132
Figura 61 – Perfil proteico das frações coletadas na purificação em Sepharose 4 FF para separação de IgM e IgA.	135
Figura 62 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM (B) e IgA (C) nas frações obtidas na purificação Sepharose 4 FF para separação de IgM e IgA.	137
Figura 63 - Cromatograma da purificação da fração pH 5,5 NaCl 300 mM em Sephacryl S300.	138
Figura 64 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras (A), análise da presença de IgM (B) e análise da presença de IgA (C) das frações obtidas na purificação da fração pH 5,5 NaCl 300 mM em Sephacryl S300.	139
Figura 65 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras das frações obtidas na purificação da fração pH 5,5 NaCl 300 mM em Sephacryl S300.	140

Figura 66 – Densitometria da fração contendo IgM da purificação em Sephacryl S300.....	140
Figura 67 – Análise da pureza de IgG nos géis de poliacrilamida por densitometria.	141
Figura 68 - Análise da pureza de albumina nos géis de poliacrilamida por densitometria.....	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características principais das imunoglobulinas.....	43
Tabela 2 – Purificação de IgM – Algumas descrições encontradas na literatura.	48
Tabela 3 - Condições experimentais para purificações nas diferentes colunas de troca iônica.	54
Tabela 4 – Condições experimentais empregadas nos experimentos na coluna Q Sepharose FF – Estratégia 2.....	58
Tabela 5 - Concentração de proteínas nos tubos da purificação de plasma em Sepharose 4FF.....	67
Tabela 6 – Dosagem de IgM nas frações da purificação de plasma em Sepharose 4FF.....	69
Tabela 7 – Dosagem de IgG nas frações da purificação de plasma em Sepharose 4FF.....	69
Tabela 8 – Dosagem de IgA nas frações da purificação de plasma em Sepharose 4FF.....	70
Tabela 9 – Concentração de proteína nas frações da purificação de plasma em Sepharose 4FF.....	70
Tabela 10 – Recuperação de imunoglobulinas na Fração 2 da purificação de plasma em Sepharose 4FF.....	70
Tabela 11 – Concentração de proteína nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF, em Q Sepharose FF.....	74
Tabela 12 – Dosagem de IgM nas frações da purificação da Fração 2/4FF em Q Sepharose FF.....	75
Tabela 13 - Concentração de proteínas nas frações da purificação da Fração 2 /4FF, em coluna monolítica QA.	77
Tabela 14 - Concentração de proteínas nas frações da purificação da Fração 2/4FF em membrana Sartobind Q Nano.....	80
Tabela 15 – Concentração de proteína nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF, em ANX Sepharose FF - 109,6 mg de proteína.	84
Tabela 16 – Dosagem de IgM nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF em ANX Sepharose FF - 109,6 mg de proteína.	85
Tabela 17 – Dosagem de IgG nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF, em ANX Sepharose FF - 109,6 mg de proteína.	85

Tabela 18 – Dosagem de IgA nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF, em ANX Sepharose FF - 109,6 mg de proteína.	86
Tabela 19 – Concentração de proteína nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF em ANX Sepharose FF – aplicação de 460 mg.	88
Tabela 20 – Dosagem de IgM nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF em ANX Sepharose FF – aplicação de 460 mg.....	89
Tabela 21 – Dosagem de IgG nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF em ANX Sepharose FF – aplicação de 460 mg.....	89
Tabela 22 – Dosagem de IgA nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF em ANX Sepharose FF – aplicação de 460 mg.....	89
Tabela 23 – Conteúdo proteico da fração 350 mM-A, obtida na purificação em ANX Sepharose FF – aplicação de 460 mg.....	91
Tabela 24 - Concentração de proteínas nas frações da purificação do eluato da coluna ANX Sepharose FF, em coluna de IMAC-Co ²⁺ , em pH 7,1.	93
Tabela 25 - Concentração de proteínas nas frações da purificação do eluato da coluna Q Sepharose FF, em coluna de IMAC-Co ²⁺ , em pH 8,0.	96
Tabela 26 - Concentração de proteínas nas frações da purificação do eluato da coluna ANX Sepharose FF, em coluna de IMAC-Co ²⁺ , em pH 6,0.	99
Tabela 27 - Concentração de proteínas nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF em IMAC-Co ²⁺ , em pH 7,1.	101
Tabela 28 – Comparação da recuperação e fator de purificação de IgM utilizando as colunas de troca aniônica Q Sepharose FF e ANX Sepharose FF.	105
Tabela 29 – Recuperação e Fator de purificação de IgM na Estratégia 1.....	106
Tabela 30 – Concentração de proteína no FT da purificação de plasma em ANX Sepharose FF.....	109
Tabela 31 – Recuperação de IgM, IgG e IgA na purificação de plasma em ANX Sepharose FF.....	109
Tabela 32 – Concentração de proteína nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 1.....	111
Tabela 33 – Concentração de proteína nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 2.....	114
Tabela 34 – Concentração de proteína nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 3.....	116

Tabela 35 – Concentração de proteína nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 4.....	119
Tabela 36 – Concentração de proteína nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 5.....	124
Tabela 37 – Concentração de proteína nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 6.....	126
Tabela 38 – Dosagem de IgM nas frações da purificação do FT, proveniente da purificação de plasma em ANX Sepharose FF, em Q Sepharose FF – Experimento 6.	129
Tabela 39 – Dosagem de IgG nas frações da purificação do FT, proveniente da purificação de plasma em ANX Sepharose FF, em Q Sepharose FF – Experimento 6.	129
Tabela 40 – Dosagem de IgA nas frações da purificação do FT, proveniente da purificação de plasma em ANX Sepharose FF, em Q Sepharose FF – Experimento 6.	130
Tabela 41 – Concentração de proteína nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 7.....	131
Tabela 42 – Dosagem de IgM nas frações da purificação do FT, proveniente da purificação de plasma em ANX Sepharose FF, em Q Sepharose FF – Experimento 7.	133
Tabela 43 – Dosagem de IgG nas frações da purificação do FT, proveniente da purificação de plasma em ANX Sepharose FF, em Q Sepharose FF – Experimento 7.	134
Tabela 44 – Dosagem de IgA nas frações da purificação do FT, proveniente da purificação de plasma em ANX Sepharose FF, em Q Sepharose FF – Experimento 7.	134
Tabela 45 - Conteúdo de imunoglobulinas na fração eluída da coluna Q Sepharose FF – Experimento 7.....	135
Tabela 46 – Concentração de proteínas nas frações da purificação em Sepharose 4 FF para separação de IgM e IgA.....	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **Abs:** Absorbância
- **ANX:** Dietilaminopropil
- **APS:** Persulfato de amônio
- **BSA:** Albumina sérica bovina
- **CPDA-1:** Citrato-Fosfato-Dextrose-Adenina
- **EDTA:** ácido etileno-diamino-tetracético
- **FF:** fast flow
- **FT:** flow through
- **FVIII/FvW:** Fator VIII/ Fator de von Willebrand
- **HEPES:** ácido 4- (2- hidroxietil) – 1- piperazinaetanosulfônico
- **IDA:** ácido iminodiacético
- **Ig:** imunoglobulina
- **IVIg:** imunoglobulina de uso intravenoso
- **IMAC:** Cromatografia de Afinidade a Metal Imobilizado
- **NTA:** ácido nitrilotriacético
- **PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida
- **pI:** ponto isolelétrico
- **PFC:** plasma fresco congelado
- **SDS:** Dodecil Sulfato de Sódio
- **TED:** N, N, N – tris (carboximetil) etilenodiamina
- **TEMED:** N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina
- **TREN:** Tris (2-aminoetil) amina
- **UI:** Unidades Internacionais
- **VC:** Volume de coluna

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Hemoderivados e seu uso	25
2.2 Histórico da produção e uso de Hemoderivados	25
2.3 Obtenção de plasma para fracionamento	26
2.4 Plantas de Fracionamento e mercado de Hemoderivados no mundo.....	28
2.5 Hemoderivados no Brasil	31
2.6 Hemoderivados no Instituto Butantan.....	32
2.7 Purificação de proteínas plasmáticas pelo método de Cohn	34
2.8 Purificação de proteínas por cromatografia	36
2.8.1 Cromatografia de Gel filtração.....	37
2.8.2 Cromatografia de Troca iônica	37
2.8.3 Cromatografia de Afinidade.....	39
2.9 Imunoglobulinas.....	41
1.9.1 Imunoglobulina M.....	43
2.10 Purificação de Imunoglobulina M	45
3 OBJETIVO	49
3.1 Objetivo geral	49
3.2 Objetivos específicos.....	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 Material.....	50
4.2 Preparo do plasma	52
4.3 Purificação de IgM - Estratégia 1	52
4.3.1 Purificação de IgM a partir de plasma humano em coluna de gel filtração Sepharose 4FF.....	53
4.3.2 Purificação da Fração 2 da Sepharose 4FF em colunas de troca aniônica	53
4.3.3 Purificação do eluato da coluna de troca aniônica em coluna de afinidade a metal (IMAC-Co ²⁺).....	54
4.3.4 Purificação da Fração 2 da Sepharose 4 FF em coluna de afinidade a metal (IMAC-Co ²⁺).....	55
4.4 Purificação de IgM – Estratégia 2	56
4.4.1 Purificação de plasma em ANX Sepharose FF	57

4.4.2 Purificação do FT/ANX em Q Separose FF.....	57
4.4.3 Separação de IgM e IgA por Sepharose 4 FF.....	59
4.4.4 Separação de IgM e IgA por gel filtração Sephacryl S-300.....	59
4.5 Métodos analíticos	60
4.5.1 Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford	60
4.5.2 Dosagem de IgM, IgG e IgA por turbidimetria	60
4.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	61
4.5.4 Análise da presença de IgM, IgG e IgA por western blot	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 Estratégia 1	64
5.1.1 Mapeamento de IgM na coluna Sepharose 4 FF	65
5.1.2 Análise das frações da coluna Sepharose 4 FF.....	69
5.1.3 Purificação da Fração 2/ 4FF em coluna Q Sepharose FF	72
5.1.4 Purificação da Fração 2/ 4FF em coluna monolítica QA	76
5.1.5 Purificação da Fração 2/4FF em membrana Sartobind Q Nano.....	79
5.1.6 Purificação da Fração 2/ 4FF em coluna ANX Sepharose FF.....	82
5.1.7 Purificação de IgM empregando cromatografia de afinidade a metal (IMAC-Co ²⁺).....	91
5.1.8 Discussão Geral da Estratégia 1 da purificação de IgM.....	102
5.2 Estratégia 2	107
5.2.1 Purificação de plasma em ANX Sepharose FF - obtenção da amostra de entrada.....	108
5.2.2 Experimento 1 - pH 8,0, 6,0, 4,5 e 4,0.....	109
5.2.3 Experimento 2 – pH 8,0, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5 e 4,0	112
5.2.4 Experimento 3 – pH 6,0, 5,5, 5,0 e 4,0.....	115
5.2.5 Experimento 4 – gradiente de NaCl em pH 6,0.....	118
5.2.6 Experimento 5 – pH 8,0, pH 5,5, pH 5,5 com NaCl 300 mM	122
5.2.7 Experimento 6 – Diluição da amostra e equilíbrio da coluna com solução de acetato de sódio em pH 8,0 e mesmo gradiente do experimento 5: pH 8,0,pH 5,5 e pH 5,5 com NaCl 300 mM	125
5.2.8 Experimento 7 – repetição do gradiente 6 com aplicação de maior quantidade de amostra.....	130
5.2.9 Separação de IgM e IgA por Sepharose 4FF.....	135
5.2.10 Separação de IgM e IgA por gel filtração Sephacryl S300	137

5.2.11 Comparação das amostras de IgG e albumina	140
5.2.12 Discussão Geral da Estratégia 2 da purificação de IgM.....	142
6 CONCLUSÃO	146
REFERÊNCIAS.....	148

1 INTRODUÇÃO

A utilização de componentes e derivados do sangue vem se tornando cada vez mais importante, uma vez que apresenta grande importância no âmbito da saúde pública, já que podem ser utilizados na prevenção e tratamento de diversas doenças, traumas, desordens imunológicas, infecções (BURNOUNF, 2007) e deficiências congênitas (FARRUGIA et al., 2009).

O Brasil arrecada cerca de 3,6 milhões de bolsas de sangue por ano (BRASIL, 2014). Com o intuito de aproveitar essas bolsas de plasma, estão em construção duas plantas de Hemoderivados no Brasil, uma no Instituto Butantan, em São Paulo, e a outra em Goiana, em Pernambuco, denominada Hemobrás.

Nos anos 90, a imunoglobulina G de uso intravenoso (IVIg) se tornou o principal produto das indústrias de fracionamento, perfil que permanece nos dias atuais. Em 2009, a IVIg representava 40-50% do mercado de proteínas do plasma (RADOSEVICH; BURNOUNF, 2010).

Paralelamente, o interesse pela imunoglobulina M (IgM) vem crescendo ao longo dos anos devido à sua eficácia no tratamento de algumas doenças. A IgM proveniente do plasma tem sido utilizada principalmente no tratamento de infecções e também no tratamento de doenças autoimunes (KAVERI; SILVERMAN; BAYRY, 2012). Segundo Norrby-Teglund, Haque e Hammarstrom (2006), a forma pentamérica da IgM contribui para uma eficácia superior na neutralização de toxinas e aglutinação bacteriana em relação a IgG. Além da IgM proveniente de plasma, existe no mercado IgM monoclonais, mas são utilizados para outros fins, como para tratamento de câncer.

Existe no mercado um único produto comercial enriquecido de IgM denominado Pentaglobin[®], produzido pela Biotest (GAUTAM; LOH, 2011), ainda não disponível no Brasil.

Neste trabalho desenvolvemos 2 estratégias para a purificação de IgM. A primeira estratégia foi desenhada a partir de um processo existente, usado para a purificação de fator VIII de coagulação. Este processo foi projetado para o Instituto Butantan, através de uma parceria com a GE Healthcare, para a purificação sequencial de quatro proteínas: fator VIII de coagulação, fator IX de coagulação, albumina e IgG apenas por cromatografia (Figura 1). A primeira coluna cromatográfica é uma gel filtração em Sepharose 4FF e a purificação de IgM iniciou-

se com uma fração desta coluna, não utilizada na produção, que é coletada entre 2 frações, que continuam no processo. A segunda estratégia para a purificação de IgM vem de um processo que está em desenvolvimento no laboratório. Os fatores de coagulação são inicialmente separados do plasma (NAKAO et al., 2014) e a purificação de IgM iniciou-se com a fração das proteínas não adsorvidas, denominada “flow through” (FT), desta purificação.

Figura 1 – Fluxograma geral do processo de purificação de Hemoderivados do Instituto Butantan.

FONTE: PINTO, 2014

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hemoderivados e seu uso

Após a coleta, o sangue total é submetido a centrifugações que separam as hemácias, leucócitos, plaquetas e o plasma e são denominados hemocomponentes. A partir do fracionamento do plasma, pode-se obter proteínas, denominadas de hemoderivados.

A imunoglobulina intravenosa (IVIg) é um dos produtos derivado de plasma mais utilizados no mundo (BERTOLINI; GOSS; CURLING, 2013). Além das imunoglobulinas pode-se citar a comercialização de concentrados dos fatores de coagulação VIII (FVIII), VII (FVII), IX (FX), XI (FXI), FXIII (FXIII), fator de von Willebrand (FvW), fibrinogênio, antitrombina, α 1- Antitripsina, Albumina e Complexo Protrombínico (BURNOUNF, 2007).

2.2 Histórico da produção e uso de Hemoderivados

Apesar do primeiro medicamento derivado de plasma ter sido as imunoglobulinas anti-toxinas (difteria, tétano), produzidas em cavalos, o início da terapia com proteínas do plasma ocorreu, na verdade, quando Edwin Cohn desenvolveu o fracionamento por precipitação com etanol a frio para isolar albumina e usar em tratamento de lesões e perda de sangue em campos de batalha (COHN et al., 1946).

Judith Pool (1965) adotou o uso de crioprecipitado, fração que contém entre outras proteínas, o FVIII, e rapidamente o método de separação do crioprecipitado foi incorporado ao método de Cohn, resultando na primeira produção industrial para terapia de hemofilia.

Na década de 70 foi reconhecido o risco da transmissão viral desses produtos. Enquanto as indústrias procuravam métodos de inativação viral para tornar o produto mais seguro na década de 80, foi desenvolvido o concentrado de FVIII recombinante, uma vez que a clonagem do FVIII foi realizada em 1984 por Glitschier.

Com os resultados dos ensaios clínicos publicados em 1989 por White et al., alguns países como Estados Unidos, Inglaterra, Canadá e Austrália passaram a adotar o uso do FVIII recombinante, aumentando assim o mercado deste produto.

Na Europa, a maioria dos países continuou a utilizar FVIII derivado de plasma devido, principalmente, à dúvida sobre a formação de inibidores utilizando uma proteína recombinante (Ettingshausen; Kreuz, 2006).

Nos anos 90, a imunoglobulina G de uso intravenoso (IVIg) se tornou o principal produto das indústrias de fracionamento, perfil que permanece nos dias atuais. A produção de IgG, albumina e FVIII formam o portfólio para os produtores e são cruciais para manutenção da viabilidade do funcionamento das indústrias de fracionamento (BURNOUF, 2006).

2.3 Obtenção de plasma para fracionamento

A questão da produção de hemoderivados inicia-se na aquisição do plasma, uma vez que é considerado um material escasso (FARRUGIA; CASSAR, 2012).

Foram estabelecidas três principais fontes de obtenção de sangue no mundo: (a) voluntário, não remunerado, que não recebe nenhuma recompensa pela doação; (b) pago, aquele doador que é recompensado monetariamente; (c) reposição, que é aquele doador que doa o sangue para repor o estoque, pois algum familiar teve que usar algum tipo de componente (FARRUGIA; PENROD; BULT, 2010).

Em países desenvolvidos prevalecem os doadores pagos e os de reposição (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Farrugia, Penrod e Bult (2010) apontaram os principais argumentos do sociólogo Titmuss contra o pagamento das pessoas pela doação de sangue:

1. O comércio desestimula o altruísmo, a doação voluntária.
2. Quando o sangue é pago torna-se mais inseguro, pois as pessoas consideradas como grupo de risco podem doar sangue somente pela necessidade do dinheiro.

O Food and Drug Administration (FDA), que é o departamento de saúde e serviços humanos dos Estados Unidos, especifica que o pagamento seja em dinheiro ou em benefícios convertidos em dinheiro (FARRUGIA; PENROD; BULT, 2010).

Na Europa, as pessoas são encorajadas, mas não obrigadas, a não receberem remuneração pela doação de sangue. Como substituição, podem ter o dia de folga no trabalho (FARRUGIA; PENROD; BULT, 2010).

Todo esse esforço baseia-se na necessidade de doações de sangue para utilização de hemocomponentes e produção de hemoderivados.

Em 2009, a World Health Organization (WHO) determinou como ideal o mínimo de 10 doações a cada 1000 habitantes. Como pode ser observado na Figura 2, muitos países em desenvolvimento não atingem essa taxa mínima.

Figura 2 – Taxa de doação de sangue por mil habitantes em diferentes países do mundo.

FONTE:

http://www.who.int/mediacentre/factsheets/donations_per1000_population_20091110.pdf.

De acordo com a Portaria MS/GM nº 2.712, de 12.11.2013, as motivações de doações de sangue no Brasil são classificadas da seguinte maneira: (a) Doação espontânea, feita por pessoas motivadas para manter o estoque de sangue do serviço de hemoterapia, decorrente de um ato de altruísmo, sem ter o nome de um possível receptor (b) Doação de reposição, realizada por um indivíduo para atender à necessidade de um paciente; (c) Doação autóloga, que o paciente doa para seu próprio uso exclusivamente (BRASIL, 2015).

A média de coletas de sangue no Brasil, de 2012 a 2014, é de 3.748.969 procedimentos realizados. Na Figura 3, observa-se o perfil de coletas nesse período, considerando os (a) serviços públicos, que correspondem aos serviços públicos

federal, estaduais e municipais, contemplando os serviços universitários públicos; (b) serviços privados contratados, que correspondem aos serviços filantrópicos e privados contratados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para complementariedade aos serviços públicos que não conseguem assumir a demanda estabelecida; (c) serviços privados, que correspondem aos serviços privados não contratados pelo SUS que assumem a demanda da rede assistencial suplementar e privada do país (BRASIL, 2015).

Figura 3 – Perfil de doação de sangue no Brasil, entre 2012 e 2014.

FONTE: (BRASIL, 2015).

No Brasil, a demanda de plasma em centros hemoterápicos é inferior ao plasma coletado, podendo o excedente ir para indústrias de fracionamento. No entanto, nem sempre essas bolsas de plasma são armazenadas adequadamente para esse fim.

2.4 Plantas de Fracionamento e mercado de Hemoderivados no mundo

Existem 78 plantas de fracionamento de plasma no mundo. A capacidade global de fracionamento em 2010 era de 48,4 milhões de litros de plasma (BERTOLINI; GOSS; CURLING, 2013).

O comércio industrial de produtos derivados de plasma é um oligopólio, em que um número pequeno de empresas comandam a maior parte do mercado. Globalmente, esse mercado é dominado por três companhias, a Grifols (que adquiriu a Talecris em 2011), a CSL Behring e a Baxter BioScience, como mostrado na Figura 4 (BERTOLINI; GOSS; CURLING, 2013).

Figura 4 – Empresas líderes em fracionamento de plasma (perfil anterior à compra da Talecris pela Grifols).

FONTE: (BERTOLINI; GOSS; CURLING, 2013)

Essas companhias tem um amplo portfólio, um processo robusto e uma presença estabelecida globalmente. A capacidade de fracionamento dessas três empresas é de 20 milhões de litros de plasma, mas em 2010 estas empresas conseguiram processar perto de 30 milhões de litros de plasma. Um segundo nível de empresas inclui a Octapharma, Kedrion e Biotest que fracionam 6 milhões de litros de plasma. Essas seis empresas foram consolidadas entre 1999 a 2011, como é mostrado na Figura 5 (BERTOLINI; GOSS; CURLING, 2013).

Figura 5 – Consolidação das maiores indústrias de fracionamento de plasma do mundo entre 1999 a 2011.

FONTE: (BERTOLINI; GOSS; CURLING, 2013)

Entre os hemoderivados mais comercializados, a IgG é responsável pela movimentação de quase metade do mercado (Figura 6).

Figura 6 – O mercado de hemoderivados no mundo entre 2003 e 2008.

FONTE: (BERTOLINI; GOSS; CURLING, 2013)

Para doenças imunes primárias indica-se 72 g de IgG para 1000 habitantes. Esse uso não representa mais que um terço do total de IgG utilizado em economias estabelecidas (FARRUGIA; PENROD; BULT, 2010).

O rendimento de IgG por litro varia entre os produtores, mas a média é de 4 g/L para produtos fracionados pelo método de Cohn (RADOSEVICH; BURNOUF; 2010). Com base neste cálculo, são necessários 37,5 L de plasma para 1000 habitantes para produzir a quantidade suficiente de IgG. Esse plasma ainda pode render 7,5 UI de FVIII per capita, que é uma quantidade excessiva quando comparado ao uso estimado e 940 g de albumina para 1000 habitantes, que também excede o consumo (FARRUGIA; PENROD; BULT, 2010).

2.5 Hemoderivados no Brasil

A questão dos hemoderivados é de grande importância, uma vez que engloba questões de saúde pública, econômica e ética.

O fato de a Constituição Federal Brasileira de 1988 ter proibido o comércio de sangue, seus componentes e derivados, reflete as questões éticas e aumenta a responsabilidade do Estado em garantir estes produtos essenciais e de alto custo à saúde pública (SOARES, 2002).

O Brasil arrecada cerca de 3,6 milhões de bolsas de sangue por ano (BRASIL, 2014). Ao mesmo tempo em que se estimula a doação voluntária de sangue, ou seja, aquela em que o doador doa motivado pelo sentimento de solidariedade humana e pelo exercício de cidadania, está se propiciando o descarte de milhares de litros de plasma humano por ano. Isto se dá porque de cada bolsa de sangue total coletada, separam-se os hemocomponentes, quais sejam a parte líquida do sangue, o plasma, e os concentrados de hemácias, de plaquetas e outros. Estes são armazenados em diferentes temperaturas, para fins transfusionais e têm durabilidade de três a 42 dias, dependendo do tipo de concentrado e do tipo de bolsa plástica usada na coleta do sangue. Os hemocomponentes celulares são transfundidos quase que integralmente. Em geral, os estoques de concentrados de hemácias e de plaquetas nos serviços de hemoterapia estão sempre no limite das necessidades. O plasma, por sua vez, tem indicações de uso terapêutico restritas, sendo imprescindíveis cuidados específicos para manter as qualidades que lhe dão valor medicinal e econômico inestimáveis, para a produção de hemoderivados (SOARES, 2002).

O plasma fresco congelado no período de até oito horas após a coleta do sangue pode ser congelado por um ano à -20°C ou a -30°C por dois anos, e

usado em transfusões ou para a produção industrial de fatores da coagulação, sendo chamado de plasma fresco congelado (PFC). Quando congelado após as primeiras oito horas da coleta ou armazenado por tempo superior ao referido, transforma-se em plasma preservado, normal ou comum. Nesse caso, as proteínas lábeis, principalmente o FVIII, perdem a atividade e o plasma torna-se indicado somente para a produção industrial de albumina e de imunoglobulinas (SOARES, 2002).

Apesar do consumo de PFC brasileiro ser considerado alto, o excedente de PFC ainda é grande e requer a implementação de alternativas que viabilizem o maior aproveitamento possível desta matéria-prima, evitando o seu desperdício.

O Ministério da Saúde compra de empresas estrangeiras os medicamentos derivados de plasma para atender a necessidade da população ao mesmo tempo em que está descartando bolsas de plasma que poderiam ser processadas no país, caso houvesse plantas de Hemoderivados. Dados do Ministério da Saúde indicam que o impacto do custo da importação destes produtos (FVIII, FIX, Albumina e Imunoglobulina intravenosa) para o país é da ordem de US\$ 282 milhões de dólares por ano, enquanto que para Protrombina parcialmente ativada, Complexo Protrombínico e concentrados de FvW/FVIII, o valor é de US\$ 33 milhões de dólares por ano (FARRUGIA et al., 2009).

Devido aos dados apresentados, o Ministério da Saúde discute a criação de fábricas para o processamento de plasma no país. Estão em construção duas plantas de Hemoderivados no Brasil, uma no Instituto Butantan, em São Paulo, e a outra em Goiana, em Pernambuco, denominada Hemobrás.

2.6 Hemoderivados no Instituto Butantan

O Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan desde a sua criação em meados da década de 1980 tem projetos voltados para a purificação de hemoderivados. Inicialmente foram desenvolvidos projetos de purificação de proteínas a partir de placentas humanas, uma vez que o plasma humano não era disponível. Proteínas, tais como albumina, catalase, IgG e superóxido dismutase foram obtidas em processos em que um ou mais produtos são purificados concomitantemente com pureza comparável aos produtos comerciais (CABRERA-CRESPO et al., 2000; GONÇALVES et al., 1999; GRELLET et al., 2001). Mais tarde

foram feitos estudos para a purificação de fator VIII suíno (LORTHIOIS, 2002; TANAKA et al., 2000), usado em tratamento de Hemofilia A com inibidores (GRIBBLE; GARVEY, 2000). Com a disponibilização do plasma humano pelo Hemocentro de Ribeirão Preto, foram iniciados estudos de purificação de fator VIII de coagulação humana (LORTHIOIS, 2002). Em abril de 2008, foi assinado um acordo com o governo do Estado de São Paulo, no qual seriam investidos 57 milhões de reais pelo governo estadual para a implantação de uma fábrica de Hemoderivados no Instituto Butantan. Além da fábrica, que está em construção, há uma Planta Piloto, e o Laboratório de Desenvolvimento de Processos, onde estão sendo desenvolvidos processos de purificação de novas de proteínas de interesse biotecnológico.

Neste contexto, foi realizado um estudo para verificar a introdução de uma troca aniônica antes da gel filtração, que, no processo da fábrica, seria a primeira etapa de purificação do fator VIII (CHENG et al., 2010; JINZENJI, 2008). A coluna de troca aniônica teria como função principal a concentração do fator VIII e, assim, seria possível utilizar um coluna de gel filtração menor. O acréscimo de uma etapa de purificação seria compensada pela economia de tempo e de custos. Entretanto, foi observado por Jinzenji (2008) e Carvalho (2008) que a concentração de NaCl nos tampões empregados na troca aniônica, utilizando a resina Q-Sepharose, tem influência sobre o tamanho do complexo FVIII/FvW, o que, conseqüentemente, interferiu no perfil de separação na coluna de gel filtração. Portanto, um estudo mais detalhado para verificar o efeito da variação da concentração de sais presentes no tampão sobre o tamanho do complexo é necessário para o sucesso da gel filtração.

A purificação de FVIII em coluna de troca aniônica a partir de plasma é interessante, porque o plasma pode ser diretamente aplicado à coluna, com rendimentos ao redor de 50% e fator de purificação de 50 vezes empregando colunas Q Sepharose (CHENG et al., 2010). Entretanto, as proteínas dependentes de vitamina K coeluem., e demonstraram que a separação de FVIII das proteínas dependentes de vitamina K pode ser obtida com sucesso, empregando colunas de afinidade a metal (IMAC) empregando Cu^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} como metais ligantes. (IWASHITA, 2012; RODRIGUEZ, 2015)

Empregando uma etapa de cromatografia de pseudoafinidade, Nakao et al. (2014) iniciaram os estudos para a separação das proteínas dependentes de

vitamina K do plasma em coluna ANX Sepharose FF. Os resultados deste trabalho deram origem à estratégia 2 utilizada neste trabalho.

Em 2014, Pinto realizou um estudo sobre presença de FXI em amostras provenientes de diversos métodos de purificação e foi constatado que o FXI acompanha a IgG em algumas situações. Esse estudo foi realizado devido a relatos na literatura apontando o FXI como responsável por eventos tromboembólicos em tratamentos com IVIg (GERMISHUIZEN et al., 2014).

2.7 Purificação de proteínas plasmáticas pelo método de Cohn

O principal método para purificação de proteínas do plasma humano baseia-se no método desenvolvido por Cohn na década de 1940 modificado (BURNOUNF, 2007; OFOSU; FREEDMAN; SEMPLE, 2008). Baseia-se na precipitação fracionada de proteínas do plasma com etanol em baixas temperaturas, com variação de pH. Os precipitados são separados por centrifugação e as proteínas de interesse seguem sendo fracionadas na linha de purificação (Figura 7).

No método de Cohn, o sangue usualmente é coletado em solução citratada (anticoagulante) e o plasma separado da fração celular por centrifugação é imediatamente congelado.

O passo inicial da purificação é a separação do crioprecipitado. O plasma é descongelado a 2-4 °C. A esta temperatura, algumas proteínas, entre as quais o fator VIII de coagulação, continuam insolúveis e são separadas por centrifugação. A etapa de separação desta fração enriquecida de fator VIII por crioprecipitação tem alto custo, uma vez que exige manipulação do plasma em ambiente refrigerado, centrifugação contínua de grande volume, além de implicar em grande perda de proteína e de atividade.

Figura 7 - Fracionamento de plasma utilizando método de Cohn.

FONTE: (Adaptado de BERTOLINI; GOSS; CURLING, 2013)

2.8 Purificação de proteínas por cromatografia

Atualmente, a maioria das plantas de Hemoderivados utiliza um processo misto de purificação por precipitação pelo método de Cohn e cromatografia, como o exemplo mostrado na Figura 8. A proposta do Instituto Butantan tem sido produzir os hemoderivados utilizando apenas métodos cromatográficos.

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada por meio da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles seja seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Figura 8 - Exemplo de um desenho de fracionamento de plasma que emprega método de Cohn e cromatografia líquida (BURNOUNF, 2007, adaptado por CHENG, 2016).

2.8.1 Cromatografia de Gel filtração

Na cromatografia de gel filtração, também conhecida pelos termos “exclusão por tamanho”, “permeação em gel” e “cromatografia em peneira molecular de difusão restrita” (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006), as moléculas sofrem partição em virtude das diferenças no tamanho das espécies, entre um solvente e a fase estacionária de porosidade definida (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Esse tipo de cromatografia tem propriedades desejáveis, tais como simplicidade técnica, insensibilidade a solventes e temperatura, condições amenas e versatilidade por poder separar proteínas com os mais diversos tamanhos. Entre outros usos, quando aplicada a uma série homóloga de polímeros como proteínas, tendo densidade e formas semelhantes, pode fornecer um método rápido e útil de determinar a massa molar e a forma dessas macromoléculas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Sepharose 4 Fast Flow (FF) é uma resina de gel filtração desenvolvida para processos industriais e permite utilização com fluxo alto e pressão moderada. É uma resina com matriz de agarose com ‘cross-linking’ de 4%. Essa resina pode separar proteínas na faixa de massa molecular de 6×10^4 e 2×10^7 kDa. O fluxo linear recomendado para trabalho é de 150-250 cm/h.

A resina Sephacryl permite purificação rápida e reproduzível de proteínas polissacarídeos e outras macromoléculas por gel filtração, tanto em escala laboratorial como em escala industrial. A matriz é composta por um copolímero de “cross-linked” de dextrana e N,N'-metileno bisacrilamida. A natureza hidrofílica da resina minimiza a adsorção inespecífica e maximiza a recuperação. A resina Sephacryl S300 utilizada nesse trabalho pode separar proteínas na faixa de massa molecular de 1×10^4 e $1,5 \times 10^6$ kDa. O fluxo linear recomendado para trabalho é de 240 cm/h.

2.8.2 Cromatografia de Troca iônica

Na cromatografia por troca iônica, a fase estacionária é altamente carregada, e solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentelemente eluídos, por deslocamentos com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior

força de interação com a fase estacionária ou por variação de pH (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

As resinas de troca aniônica são trocadoras de cargas negativas, ou seja, a resina é carregada positivamente. Por outro lado, as resinas de troca catiônica são trocadoras de cargas positivas, sendo assim carregada negativamente.

De acordo com o manual do fabricante das resinas (GE Healthcare), os termos forte e fraca se referem à extensão na qual o estado de ionização dos grupos funcionais variam com o pH. Trocadores iônicos fortes não apresentam variação da capacidade com variações de pH, não ganhando e nem perdendo prótons. Já os trocadores iônicos fracos podem ganhar ou perder prótons com alteração do pH, variando a sua capacidade. Esses termos não se referem a intensidade com que os grupos funcionais se ligam às proteínas.

A resina Q Sepharose FF é uma resina de troca aniônica forte e apresenta grupos aminas quaternárias ligados a uma matriz de agarose com 'cross-linking' de 6%. O fluxo linear de trabalho recomendado é de 400-700 cm/h.

A resina ANX Sepharose 4 FF é uma resina de troca aniônica fraca e apresenta grupos aminos terciários (grupos dietilaminopropil) ligados a uma matriz de agarose com 'cross-linking' de 4%. A distribuição de poros desta resina foi otimizada para a separação de proteínas de tamanho grande, que aumenta a capacidade de ligação enquanto separa moléculas maiores. O fluxo linear de trabalho recomendado é de ≥ 200 cm/h.

Além dessas duas resinas de material particulado, do tipo "bead", utilizamos neste trabalho uma coluna monolítica e uma membrana, ambos de troca aniônica forte, por apresentarem aminas quaternárias ligadas à matriz.

Uma fase monolítica é um meio contínuo de separação (fase ou suporte contendo uma "partícula única"), comumente em formato cilíndrico, que possui uma estrutura sólida e altamente porosa, de pequenos domínios e canais relativamente grandes, que fornecem alta permeabilidade e eficiência da coluna. A fase móvel passa pela coluna principalmente através dos canais do monolito, nominalmente de 2 μ m de diâmetro. A estrutura e a geometria destes canais oferecem uma menor resistência à vazão da fase móvel, comparada aos materiais particulados. Portanto, é possível realizar análises em vazões elevadas, mas sem perdas significativas da eficiência de separação. Esta é uma das principais vantagens oferecidas pelas fases monolíticas, além da redução do tempo de análise, sem comprometer a resolução

cromatográfica (FARIA et al., 2006). A coluna CIMmultus™ QA-8 Advanced Composite Column tem matrix de poli(glycidil metacrilato com etileno dimetacrilato) com grupos aminas quaternárias. O fluxo de trabalho recomendado é de até 7,5 VC/min para a coluna de 8 mL.

A tecnologia de membranas de adsorção oferece diversos benefícios quando comparada à cromatografia convencional, tais como fácil manuseio, elevadas vazões, capacidade de ligação de vírus dez vezes superior, menor investimento em equipamentos, menor consumo de tampão e fácil escalonamento. A coluna Sartobind Q Nano de 3 mL tem matriz de celulose reforçada, com grupos de aminas quaternárias, e poros maiores que 3 μm . O fluxo para trabalho é de 5 VC/min para a coluna de 3 mL.

2.8.3 Cromatografia de Afinidade

A metodologia da cromatografia por afinidade envolve a preparação de uma fase estacionária seletiva, por imobilização covalente de ligantes específicos à matriz ou suporte sólido. A amostra é aplicada à coluna contendo o ligante imobilizado ao suporte sólido. As moléculas que não possuem nenhuma afinidade com o ligante passam pela coluna sem serem retidas, enquanto as macromoléculas capazes de se unirem a ele são diferencialmente retidas, em função da intensidade da afinidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, também conhecida pela sigla IMAC (Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography) é uma modalidade da cromatografia de afinidade, em que moléculas ligam-se reversivelmente a íons metálicos, imobilizados nas resinas, formando complexos. Essa técnica foi proposta por Everson e Parker e popularizou-se com o trabalho publicado por Porath e colaboradores em 1976 (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009).

Esta técnica permite a separação de proteínas que possuam histidina, triptofano ou cisteína em sua superfície, os quais formam complexos com íons Cu^{2+} , Ni^{+2} , Zn^{+2} e Co^{+2} (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009; CHARCOSSET, 1998; CHEUNG; WONG; NG, 2012). Estes íons metálicos interagem com o nitrogênio aromático dos grupamentos imidazol, indol e com enxofre do grupamento tiol, respectivamente de cada aminoácido. Os íons metálicos Fe^{3+} e Al^{3+} ligam-se a

fosfato e fosfoésteres primários, podendo ser utilizados para adsorção de fosfoproteínas, e o íon Ca^{2+} coordena de maneira estável o átomo de oxigênio presente em grupos carboxílicos dos resíduos dos aminoácidos ácidos aspártico e glutâmico, podendo ser utilizado para purificação de proteínas ricas em grupamentos carboxílicos, tais como fibrinogênio e calmodulina (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009).

Íons metálicos como Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} podem ser facilmente imobilizados em resinas cromatográficas contendo agentes quelantes, tais como ácido iminodiacético (IDA), N,N,N-tris(carboximetil)etilenodiamina (TED), tris(2-aminoetil)amina (TREN) e ácido nitrilotriacético (NTA) (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009). De acordo com Porath et al., (1975), a estabilidade dos quelatos formados entre IDA com alguns íons metálicos decresce na seguinte ordem: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} \gg \text{Ca}^{2+} = \text{Mg}^{2+}$. O agente quelante é acoplado a uma matriz sólida por meio de ligações covalentes. O íon metálico, por sua vez, é imobilizado ao agente quelante por ligações de coordenação formadas entre o íon metálico e átomos de nitrogênio, oxigênio ou enxofre presentes na estrutura do agente quelante (Figura 9). De modo geral, quanto mais polidentado for o agente quelante, mais estáveis são os complexos formados com os íons metálicos, porém, menor quantidade de sítios permanece disponível para ligação com a biomolécula e, conseqüentemente, a mesma é mais fracamente adsorvida (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009).

Figura 9 - Ativação da resina e imobilização do metal.

Se necessário, pode-se acoplar um braço espaçador, por exemplo, aminohexil, entre as etapas 2 e 3.

1. Matriz "in natura"
2. Matriz ativada com epícloridrina
3. Acoplamento do agente quelante IDA
4. Imobilização do íon metálico Ni^{2+}

FONTE: (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009)

IMAC explora a interação entre espécies doadoras de elétrons presentes na superfície de biomoléculas em solução e íons metálicos imobilizados em um suporte sólido (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009). Uma outra aplicação muito conhecida para IMAC é a purificação de proteínas recombinantes que possuem cauda de poli(histidina) (CHEUNG; WONG; NG, 2012).

As moléculas adsorvidas podem ser eluídas por competição com outras espécies doadoras de elétrons (por exemplo, com imidazol ou com um agente quelante solúvel, como EDTA) ou por protonação de grupos doadores de elétrons presentes na proteína adsorvida (redução de pH). De forma geral, íons metálicos imobilizados em uma matriz podem ser removidos pela adição de EDTA (ácido etileno-diamino-tetraacético), sem que haja perda de capacidade da matriz, ou seja, ela pode ser carregada novamente com os diferentes metais (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009; CHEUNG; WONG; NG, 2012).

A coluna HisTrap HP utilizada neste trabalho é pré-empacotada, com volume de 5ml. Possui uma matriz de agarose com 'cross-linking' de 6% ligado covalentemente com um grupo quelante que é confidencial.

2.9 Imunoglobulinas

Em 1890, von Behring e Kitasato reportaram a existência de um agente no sangue capaz de neutralizar a toxina diftérica. No ano seguinte, essa molécula foi denominada de "Antikörper" ou anticorpo (SCHROEDER; CAVACINI, 2010).

As imunoglobulinas são divididas em cinco classes: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. São compostas de um par idêntico de cadeias leve com massa molecular de aproximadamente 25 kDa, que não contribuem para especificidade das classes, mas são comuns a todas as imunoglobulinas, e um par idêntico de cadeias pesada com massa molecular de aproximadamente 50 a 70 kDa (BRADLEY, 1974; MARTIN, 1969; SCHROEDER; CAVACINI, 2010). Na Figura 10 está ilustrada a estrutura básica de uma imunoglobulina G, apontando as cadeias pesadas e leves, além das ligações de ponte dissulfeto entre elas e entre as duas cadeias pesadas. A variação da composição de aminoácidos e sua sequência na cadeia pesada determinam a especificidade das imunoglobulinas (BRADLEY, 1974).

Figura 10 - Estrutura básica simplificada de imunoglobulina G.

FONTE: (RADOSEVICH; BURNOUF, 2010)

As características principais das imunoglobulinas são apresentadas na Tabela 1. Pode ser observado que a IgM tem um tamanho bem diferenciado da IgG e da IgA. Enquanto a IgM apresenta cerca de 960 kDa, a IgG e a IgA apresentam aproximadamente 150 kDa.

Além disso, é notável a concentração de IgG no sangue em relação a IgM e IgA. A IgG é a segunda proteína em maior concentração no sangue, atrás apenas da albumina (SCHALLER, 2008).

O ponto isoelétrico (pI) da IgG para as quatro subclasses é de 7,2 a 8,6, da IgM é de 4 a 9,1 e da IgA de 4 a 7,1. (GAUTAM; LOH, 2011).

Todas essas características das imunoglobulinas são muito importantes para purificá-las, pois as técnicas cromatográficas são escolhidas de acordo com essas características. Além disso, o conhecimento da concentração de cada imunoglobulina é muito relevante, pois nos auxilia nos métodos analíticos.

Tabela 1 - Características principais das imunoglobulinas.

Classe de imunoglobulina	Estrutura da subunidade	Massa molecular (kDa)	Faixa de concentração (g/L)
IgA	$\alpha_2\kappa_2/\lambda_2$	150	0,5 - 3,5
	$(\alpha_2\kappa_2/\lambda_2)_n J_{(n-2-4)}$	390-690	
IgD	$\delta_2\kappa_2/\lambda_2$	176	0,03
IgE	$\epsilon_2\kappa_2/\lambda_2$	190	0,0001 - 0,0004
IgG	$\gamma_2\kappa_2/\lambda_2$	150	
IgG1 (60%)		150	4,2 - 13,0
IgG2 (30%)		150	1,2 - 7,5
IgG3 (4%)		170	0,4 - 1,3
IgG4 (6%)		150	0,01 - 2,9
IgM	$(\mu_2\kappa_2/\lambda_2)_5 J$	960	0,5 -2,0

FONTE: (Adaptado de SCHALLER, 2008)

1.9.1 Imunoglobulina M

A IgM representa uma das maiores classes de imunoglobulinas no organismo. Apesar da massa molecular de 190 kDa de um monômero de IgM, a IgM circulante existe em maior frequência na forma de pentâmero e às vezes na forma de hexâmero. A IgM pentâmero está geralmente associado à cadeia J (Figura 11), e forma uma macromolécula de aproximadamente 970 kDa (KAVERI; SILVERAMN; BAYRY, 2012), enquanto que a IgM na forma de hexâmetro não apresenta a cadeia J (MÜLLER et al., 2013). Em adultos saudáveis, geralmente a IgM circulante está presente na concentração de 1 a 2 mg/ml com meia vida de aproximadamente 5 dias (KAVERI; SILVERAMN; BAYRY, 2012).

A IgM é o primeiro anticorpo produzido durante uma resposta imune e a primeira classe de anticorpo presente em todas as espécies de vertebrados (EHRENSTEIN; NOTLEY, 2010; KLIMOVICH, 2011). Está presente ligado à superfície de células B ou presente no sangue, na forma secretada (EHRENSTEIN; NOTLEY, 2010).

Figura 11 - Estrutura pentamérica da imunoglobulina M.

FONTE: (SCHALLER, 2008)

Desde a descoberta de que o soro de camundongos continha anticorpos naturais que reconhecem toxinas bacterianas e vários antígenos virais, muitos estudos tem identificado um papel da IgM imune e natural na proteção contra numerosos vírus, bactérias, fungos e infecções parasitárias (EHRENSTEIN; NOTLEY, 2010).

Estudos revelam que há uma redução de IgM no sangue de pessoas com doença autoimune, como o lúpus eritematoso sistêmico. O motivo ainda não está totalmente esclarecido, mas é possível que a deficiência na quantidade de IgM predisponha as pessoas à doenças autoimunes, como foi demonstrado em camundongos (EHRENSTEIN; NOTLEY, 2010), fazendo com que a quantidade de auto-IgG aumente, ou seja, a pessoa começa a criar anticorpos contra seu próprio organismo (EHRENSTEIN; COOK; NEUBERGER, 2000).

Desta forma, obtendo-se concentrados de IgM é possível utilizar no tratamento de infecções associado à sepse, assim como para rejeição de transplantes e doenças autoimunes (KAVERI; SILVERAMN; BAYRY, 2012), enfatizando que o tratamento com IgM é um tratamento adjuvante ao tratamento convencional para cada doença.

O primeiro e único produto de preparação de IgM intravenoso comercializado é denominado Pentaglobin[®], e é produzido pela Biotest (GAUTAM; LOH, 2011). De

acordo com a bula do fabricante Biotest, um mL dessa preparação enriquecida de IgM contem 50 mg de proteínas do plasma humano, que corresponde a pelo menos 95% de imunoglobulinas. Destas imunoglobulinas, 6 mg é de IgM (12%), 6 mg de IgA (12%) e 38 mg de IgG (76%).

Ainda segundo o fabricante, o uso de uma preparação enriquecida de IgM é mais eficiente do que o uso de IgG, pois a IgM apresenta:

- Atividade de opsonização 1000 vezes maior
- Potente poder de aglutinação 100 vezes maior
- Atividade fagocítica 100 vezes maior
- Ativação específica do sistema complemento 400 vezes maior

Segundo Norrby-Teglund, Haque e Hammrstrom (2006), a forma pentamérica da IgM contribui para uma eficácia superior na neutralização de toxinas e aglutinação bacteriana em relação a IgG. Ainda segundo esses autores, as propriedades da IgA é menos conhecida. Entretanto, a IgA tem mostrado ter propriedades anti-inflamatória.

2.10 Purificação de Imunoglobulina M

Para a obtenção de imunoglobulinas purificadas tem sido descrito na literatura várias combinações de purificação por precipitação e cromatografia. Não há muitos trabalhos específicos de purificação de IgM. Na Tabela 2 estão resumidos alguns trabalhos mais relevantes que empregam a cromatografia líquida ou não para a purificação de IgM.

Precipitação com sulfato de amônio, polietilenoglicol e ácido caprílico já foram descritos para purificação de IgM (NIKOLAYENKO et al., 2005; PEROSA et al., 1990; TATUM, 1993). A separação de proteínas por precipitação é interessante, pois as proteínas possuem diferentes coeficientes de sedimentação, o que faz com que elas se separem com diferentes concentrações de sulfato de amônio, polietilenoglicol ou ácido caprílico associado a centrifugações. No entanto, os métodos de precipitação são métodos drásticos, o que pode causar a desnaturação das proteínas, além de ser um método menos robusto.

A cromatografia de afinidade à Proteínas A ou à Proteína G é uma das técnicas mais utilizadas para purificação de IgG monoclonal e tem sua importância devido à sua especificidade na captura desta proteína. Vidal e Conde (1981)

descreveram a purificação de IgM utilizando a Proteína A. A IgM é separada da IgG, pois ela não adsorve à coluna, enquanto a IgG é adsorvida. Alternativas para esse método tem sido estudadas, uma vez que a utilização de Proteína A ou G aumenta o custo de uma produção. Outra desvantagem é a possibilidade de ocorrência de escape do ligante, contaminando assim o produto com as proteínas A ou G, que são proteínas imunogênicas e que podem trazer complicações à pessoa que receber esse produto. Além disso, é necessário ter um cuidado maior na sanitização da coluna, pois a utilização de solução de NaOH, que é a mais utilizada para este fim, pode levar à proteólise da proteína A.

A cromatografia de afinidade a metal é uma alternativa à cromatografia de afinidade à Proteína A. Esse tipo de cromatografia é bastante utilizada para purificar proteínas recombinantes com cauda de histidina. No entanto, algumas proteínas, já possuem naturalmente histidinas em sua estrutura, o que possibilita a utilização dessa técnica para purificá-las. As imunoglobulinas apresentam regiões na cadeia pesada que contém histidinas e que por isso podem ser purificadas por esse método (MARTINS et al., 2006a, 2006b). Essa técnica apresenta a vantagem de ter um custo baixo em relação a cromatografia de afinidade à Proteína A ou G, além de poder separar as proteínas utilizando a mesma matriz imobilizada, mas com diferentes íons metálicos imobilizados.

Em um estudo mais recente (SROUR et al., 2013) foi descrita a purificação de IgM utilizando uma resina imobilizada com histidina como alternativa à purificação com Proteína A e IMAC.

Na literatura, a maioria dos trabalhos descritos para purificação de imunoglobulinas utilizam diversos tipos de resinas de troca iônica (BREEN et al., 2012; BRNE et al., 2007; JEHANLI; HOUGH, 1981; JOHNSON; LIBBY, 1980; SAMPSON; HODGEN; ARTHUR, 1984). A purificação por troca iônica é uma excelente alternativa para purificação de IgM por ser um método simples e de baixo custo. A maioria dos trabalhos descrevem que a IgG não é adsorvida, enquanto a IgM é adsorvida à coluna.

Alguns trabalhos descrevem a utilização de cromatografia de gel filtração para purificação de IgM (NIKOLAYENKO et al., 2005; PATTISON; MACE, 1975; PEROSA et al., 1990). Teoricamente, a técnica de gel filtração seria o melhor método de separação de IgM e IgG, pois as duas proteínas possuem massas moleculares bastante distintas, de 970 kDa e 150 kDa, respectivamente. No entanto, a separação

não é tão simples, principalmente quando se trata de uma amostra composta por diversas proteínas como o plasma, requerendo outras etapas de purificação. Além disso, em geral é aplicado apenas cerca de 2% de volume de amostra em relação do volume da coluna. Em escala industrial normalmente a gel filtração é utilizada em etapas de polimento.

Todos os métodos apresentam suas vantagens e desvantagens, e é necessário que seja estudada a melhor estratégia para alcançar o maior nível de pureza, com bons rendimentos e com custos reduzidos.

Neste trabalho desenvolvemos 2 estratégias para a purificação de IgM. A primeira estratégia foi desenhada a partir de um processo existente, usado para a purificação de fator VIII de coagulação. Por ser uma fração proveniente de uma coluna de gel filtração, a fração inicial não contém, pelo menos em grande quantidade, as proteínas de alta massa, como FVIII, fator de von Willebrand e fibrinogênio. Em relação às proteínas de menor massa, a fração inicial de purificação também não deve conter, pelo menos em grande quantidade, a albumina e as imunoglobulinas IgG e IgA. A coluna inicial escolhida para enriquecer a IgM na amostra foi uma troca aniônica, porque é conhecida a diferença de afinidade entre IgM e IgG por esse tipo de coluna. A segunda estratégia para a purificação de IgM vem de um processo que está em desenvolvimento no laboratório. Os fatores de coagulação FVIII e as proteínas dependentes de vitamina K são separados do plasma em coluna ANX Sepharose FF. Ao contrário da primeira estratégia, a fração inicial de purificação desta estratégia contém mais de 99% das proteínas do plasma, sendo necessário levar em consideração não somente a presença de IgG, mas também a de albumina, a proteína mais abundante do plasma. Para tanto, também escolhemos uma troca aniônica, porque existem dados na literatura mostrando a separação de albumina e IgG e de IgM de IgG por este tipo de coluna.

Tabela 2 – Purificação de IgM – Algumas descrições encontradas na literatura.

Material	Técnica de purificação	Coluna/Matriz	Pureza final (%)	Rendimento (%)	Referência
Soro humano	Gel filtração	Sephadex G-200 Bio-Gel A-5M	-	-	Pattison e Mace (1975)
Soro humano	Troca aniônica	QAE Sephadex A-50	-	80	Johnson e Libby (1980)
Plasma humano desfibrinado	Gel filtração	Ultrogel AcA 34	puro (SDS-PAGE)	70	Jehanli e Hough (1981)
	Troca aniônica	DEAE Sepharose CL6B			
Soro humano	Gel filtração	Sephacryl S-300	-	50	Vidal e Conde (1981)
	Afinidade a Proteína A	A-Sepharose			
Soro humano	Troca aniônica	Mono Q	-	-	Sampson, Hodgen e Arthur (1984)
Soro humano	Precipitação	Sulfato de amônio	-	67-96	Perosa et al. (1990)
	Gel filtração	Sephacryl S-300			
Plasma obtido por plasmaferese	Precipitações	Sulfato de amônio e Polietilenoglicol	95	65-80	Tatum (1993)
Monoclonal IgM	Troca aniônica - membrana	Sartobind Q15	98	30	Jacobin et al. (2004)
Soro	Precipitação	Polietileno Glicol	100 (SDS-PAGE)	-	Nikolayenko et al. (2005)
	Gel filtração	Sephacryl S-300			
Monoclonal IgM	Afinidade a metal	IMAC-Co ²⁺	-	98	Martins et al. (2006a)
Monoclonal IgM	Afinidade a metal	IMAC-Co ²⁺	-	98	Martins et al. (2006b)
Soro humano	Troca aniônica - Coluna monolítica	CIM QA, CIM DEAE, CIM EDA	-	-	Brne et al. (2007)
Criopobre de plasma humano	Afinidade a Proteína A	Toyopearl AF-rProtein A-650F	puro (SDS-PAGE e western blot)	-	Breen et al. (2012)
	Troca aniônica - Coluna monolítica	CIM QA			
Soro humano	Afinidade	Histidina-epoxy-sepharose	37-38	40	Srouf et al. (2013)
		Histidina-bisoxirane-sepharose	96-99	90	

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho foi purificar IgM a partir do plasma humano, empregando cromatografia líquida.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram avaliar a eficiência de duas estratégias diferentes para purificação de IgM:

- Estratégia 1: a partir de uma fração não utilizada na primeira coluna (gel filtração em Sepharose 4FF) do processo de purificação de Hemoderivados do Instituto Butantan.
- Estratégia 2: a partir da fração das proteínas não adsorvidas à coluna de troca aniônica, que foi empregada para separar os fatores de coagulação FVIII e proteínas dependentes de vitamina K do plasma.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

As bolsas de plasma fresco congelado humano utilizadas foram cedidas gentilmente pela Associação Beneficente de Coleta de Sangue (Colsan). O plasma foi coletado em bolsas com volume de aproximadamente 200 mL, contendo tampão CPDA-1 (Citrato – Fosfato – Dextrose – Adenina), com pH aproximado de 7,4. Todas as bolsas recebidas foram testadas e possuem resultado negativo para Doença de Chagas, Sífilis, Hepatite B e C, HIV e HTLV I/II. Além disso, possuem Teste de Ácido Nucléico (NAT) negativos para HIV e HCV. As bolsas foram armazenadas em freezer - 30 °C.

Os equipamentos utilizados foram: Cromatógrafos Akta Explorer[®] e o Akta Purifier[®], ambos da GE Healthcare (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) controlados pelo programa UNICORN[®] versões 3.1 e 5.01; Leitor de microplacas SPECTRA max 340 PC (Molecular Devices, Califórnia, EUA) controlado pelo programa SoftMax Pro, versão 6.1; Fonte para eletroforese – PowerPac[™] Basic [Biorad (Biorad, Singapura)]; Sistema de imagem para revelação de western blot - EL Logic 2200 Imagine System, controlado pelo programa Carestream.

As resinas da GE Healthcare utilizadas foram: Sepharose 4 FF, Q Sepharose Fast Flow (FF), ANX Sepharose 4 Fast Flow (FF), Sephacryl S-300, HisTrap HP de 5 mL e Hi Trap Q FF de 5 mL. Também foi utilizada a coluna monolítica CIMmultus[™] QA-8 Advanced Composite Column de 8 mL [Bia Separations (BiaSeparations, Ajdovščina, Eslovênia)] e a membrana Sartobind Q Nano de 3ml [Sartorius Stedim Biotech GmbH (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Alemanha)].

A heparina utilizada foi Hepamax-S[®] - Heparina Sódica, 5000 UI, Solução injetável, Heparina de mucosa intestinal de suínos [Blaüsiegel (Blaüsiegel, São Paulo, Brasil)].

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada do sistema MilliRiOs, da Millipore[®] [Millipore (Millipore, Billerica, EUA)].

Os reagentes utilizados para a realização dos testes analíticos foram: ácido cítrico [Synth (Synth, Diadema, Brasil)], cloreto de sódio [Nuclear (Nucelar, Brasil)], cloreto de cálcio [(Merck, Darmstadt, Alemanha)], Imidazol [USB (USB, Alemanha)], EDTA Dissódico [VETEC (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil)], NaOH [F. Maia (F. Maia,

Cotia, Brasil)], HCl (Merck), Tris Hidroximetil-aminometano [Calbiochem (Calbiochem, USA)].

A coluna de afinidade a metal foi carregada com o metal utilizando solução de CoCl_2 na concentração de 0,1 M [Spectrum (Spectrum, New Brunswick)].

Para a realização dos testes analíticos foram utilizados: Etanol (Synth e Merck), Metanol (Merck), Ácido Fosfórico (Nuclear), Sulfato de amônio (Merck), Sulfato de alumínio (Synth), Coomassie Blue G250 (Serva), Reagente de Bradford [Fermentas (Fermentas, EUA)], Acrilamida e N, N' – Metileno-bis-acrilamida [Amersham Biosciences (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)], Persulfato de amônio (Amersham Biosciences), TEMED (Sigma), azul de bromofenol (Synth), Glicerol (Merck), SDS (Amresco), β -mercaptoetanol (Merck), Glicina (Merck), Tween 20 [Sigma (Sigma, St. Louis, EUA)], BSA [Pierce (Pierce, Rockford, EUA)]; Kit SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate [Thermo Scientific (Thermo Scientific, Rockford, USA)], padrões de massa molecular: Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas/Thermo Scientific), PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas/ Thermo Scientific) e Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers (GE Healthcare).

O IgG usado como padrão foi o produto comercial Sandoglobulina[®] Privigen[®], da CSL Behring, contendo solução a 10% (m/v).

O padrão de IgM utilizado foi o IgM Human Serum, da Sigma.

Os reagentes utilizados para a dosagem das imunoglobulinas por turbidimetria foram: Topkal Multi Turbi [Kovalent (Kovalent, Rio de Janeiro, Brasil)]; IgM Mono (Kovalent); IgG Mono (Kovalent); IgA Mono (Kovalent).

Os anticorpos utilizados no western blot foram: IgM (R1/69) [Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA)]; Peroxidase-Labeled Affinity Purified Antibody to Human IgM (μ) – [KPL (KPL, Maryland, EUA)]; ImmunoPure[®] Goat Anti-Human IgG (H+L), Peroxidase Conjugated (Pierce); ImmunoPure[®] Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L), Peroxidase Conjugated (Pierce); Goat anti-human IgA (Sigma); Rabbit anti-goat IgG peroxidase (Sigma).

O sistema para SDS-PAGE utilizado foi o Hoefer (GE Healthcare) e para transferência foi o sistema da Biorad.

As membranas para western blot utilizadas foram: Immobilon-P em PVDF (Millipore) e Amersham[™] Hybond[™] em PVDF (GE Healthcare).

4.2 Preparo do plasma

As bolsas de plasma que estavam armazenadas em freezer - 30 °C foram descongeladas em banho-maria à 30 °C. Foi feito um “pool” com 5 bolsas. Para a estratégia 1 acrescentou-se heparina até obter uma concentração final de 1000 UI para 1 L de plasma. Para a Estratégia 2 não foi acrescentado a heparina e o pH foi ajustado para pH 6,0 com solução de ácido cítrico 0,25 M. Em ambos os casos, o plasma foi filtrado com gaze para retirar possíveis resíduos sólidos existentes.

4.3 Purificação de IgM - Estratégia 1

Na estratégia 1 (Figura 12) aplicamos o plasma na coluna Sepharose 4 FF. Inicialmente, coletamos amostras de 10 mL e mapeamos a presença de albumina, IgM e IgG. A partir desse experimento passamos a recolher 4 frações. A fração 2 foi posteriormente aplicada em 4 colunas de troca aniônica e na coluna de afinidade a metal (IMAC- Co^{2+}). E finalmente, o eluato da coluna de troca aniônica foi aplicada na coluna IMAC- Co^{2+} .

Figura 12 – Fluxograma geral da Estratégia 1, utilizada para purificação de IgM.

4.3.1 Purificação de IgM a partir de plasma humano em coluna de gel filtração Sepharose 4FF

A primeira etapa de purificação do IgM foi realizada em coluna de gel filtração Sepharose 4FF, seguindo as condições experimentais previstas para o processo da fábrica de Hemoderivados do Instituto Butantan. A coluna XK 26/70 tinha aproximadamente 300 mL. Foi aplicado 20% do volume de coluna (VC) de plasma e o tampão utilizado foi o citrato de sódio 20 mM, CaCl_2 2,6 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0. O Fluxo utilizado foi de 50 cm/h.

Foram realizadas 5 corridas para obter material de trabalho suficiente para as próximas etapas.

A análise das frações coletadas foi feita por Bradford, gel de poliacrilamida e western blot.

Após cada experimento, a coluna foi lavada com 2 VC de NaOH 1 M e 5 VC de água. A coluna foi armazenada em NaOH 20 mM. O equipamento foi sanitizado com NaOH 0,5 M e água.

4.3.2 Purificação da Fração 2 da Sepharose 4FF em colunas de troca aniônica

Nessa segunda etapa de purificação, aplicamos a Fração 2, proveniente da purificação em Sepharose 4FF, em diferentes colunas de troca iônica: Q Sepharose FF, ANX Sepharose FF, coluna monolítica QA e membrana Sartobind Q. As condições experimentais utilizadas estão descritas na Tabela 3.

As amostras foram analisadas quanto ao conteúdo de proteínas totais pelo método de Bradford e por SDS-PAGE e a análise da presença de IgM, IgG e IgA por turbidimetria e western blot.

Tabela 3 - Condições experimentais para purificações nas diferentes colunas de troca iônica.

	Q Sepharose FF	ANX Sepharose FF	QA	Sartobind Q
Volume da coluna	45,6 mL	48,3 mL	8 mL	3 mL
Volume de Fração 2 aplicado	40 mL 0,87 VC	40 mL 0,82 VC	22,5 mL 2,8 VC	12 mL 4 VC
Dessalinização da amostra	Não	Não	Sim	Não
Tampão de equilíbrio	Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,1	Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,1	Tris-HCl 20 mM, pH 7,1	Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,1
Gradiente	Step NaCl 200, 350 e 500 mM	Step NaCl 200, 350 e 500 mM	Linear 0 – 1 M em 10 VC	Step NaCl 200, 350 e 500 mM
Fluxo	0,54 VC/min	0,52 VC/min	2,5 VC/min	5 VC/min
Limpeza da coluna	NaOH 1 M, NaCl 2 M e água	NaOH 1 M, NaCl 2 M e água	NaOH 1 M, NaCl 2 M e água	NaOH 1 M, NaCl 2 M e tampão de equilíbrio
Armazenamento da coluna	NaOH 0,2 M	NaOH 0,2 M	Etanol 20%	Etanol 20%

Para a coluna ANX Sepharose FF fizemos um experimento aplicando uma maior quantidade de amostra (4,1 VC) para poder quantificar melhor as imunoglobulinas.

4.3.3 Purificação do eluato da coluna de troca aniônica em coluna de afinidade a metal (IMAC-Co²⁺).

A coluna HisTrap HP de 5 mL foi carregada com solução de CoCl₂ 0,1 M. O excesso da solução do metal foi lavado com água e com tampão Tris 20 mM, contendo NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM, pH 6,0, pH 7,1 ou pH 8,0. Em seguida, a coluna foi equilibrada com tampão Tris 20 mM, contendo NaCl 500 mM, pH 6,0, pH 7,1 ou pH 8,0.

No experimento em pH 7,1 a amostra 350 mM-A (23 VC) da purificação em ANX Sepharose FF foi aplicada diretamente na coluna IMAC-Co²⁺. No experimento em pH 8,0 a amostra 350 mM-A (25 VC) da purificação em Q Sepharose FF foi aplicada na coluna IMAC-Co²⁺ após o ajuste do pH para 8,0 com solução de NaOH

1M. Nestes experimentos foi feito um gradiente linear de imidazol de 0 a 500 mM imidazol em 20 VC e passamos mais 10 VC do tampão mais concentrado para uma lavagem final. As frações foram coletadas em frações de 5 mL.

No experimento em pH 6,0 a amostra 350 mM-A (24 VC) da purificação em ANX Sepharose FF foi aplicada na coluna IMAC- Co^{2+} após o ajuste do pH para 6,0 com solução de HCl 1:1. Foi feito um gradiente linear de imidazol de 0 a 200 mM em 20 VC. As frações foram coletadas em frações de 5 mL.

Para análises de SDS-PAGE e western blot, o FT foi concentrado 10 vezes, utilizando uma coluna His Trap Q FF de 5mL. Para isso, foi diluído para até que a concentração de NaCl fosse de 150 mM, aplicado à coluna e eluído com NaCl 350 mM.

Após cada experimento a coluna foi lavada seguindo o seguinte procedimento: NaCl 0,9% (m/v), Tampão citrato com EDTA 50 mM, NaCl 0,9% (m/v), NaOH 1 M, água, NaCl 1 M, água. A coluna foi armazenada em solução CoCl_2 0,1M.

Foram realizados os testes de dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford, análise do perfil de proteínas por SDS-PAGE e análise da presença de IgM e IgG por western blot com as amostras das purificações.

4.3.4 Purificação da Fração 2 da Sepharose 4 FF em coluna de afinidade a metal (IMAC- Co^{2+})

A coluna HisTrap HP de 5 mL foi carregada com solução de CoCl_2 0,1 M. O excesso da solução do metal foi lavado com água e com tampão Tris 20 mM, contendo NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM, pH 7,1. Em seguida, a coluna foi equilibrada com tampão Tris 20 mM, contendo NaCl 500 mM, pH 7,1.

A Fração 2 da purificação em Sepharose 4 FF (2,5 VC) foi aplicada diretamente na coluna de IMAC- Co^{2+} . Foi feito um gradiente linear de imidazol de 0 a 500 mM em 20 VC e seguida de 10 VC do tampão mais concentrado. As frações foram coletadas em frações de 5 mL durante o gradiente linear e na lavagem foram coletadas frações de 10 mL.

Após cada experimento a coluna foi lavada seguindo o seguinte procedimento: NaCl 0,9% (m/v), Tampão citrato com EDTA 50 mM, NaCl 0,9% (m/v), NaOH 1 M, água, NaCl 1 M, água. A coluna foi armazenada em solução CoCl_2 0,1M.

Foram realizados os testes de dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford, análise do perfil de proteínas por SDS-PAGE e análise da presença de IgM e IgG por western blot com as amostras das purificações.

4.4 Purificação de IgM – Estratégia 2

A Estratégia 2 é um processo que vem sendo desenvolvido em nosso laboratório. Consiste em utilizar um plasma pobre de fatores de coagulação para purificar IgM. Os fatores de coagulação são fortemente adsorvidos à coluna ANX Sepharose FF (VC = 48,3 mL) e eluidos com NaCl 500 mM e a grande parte das proteínas do plasma não é adsorvida, sendo recuperada na fração denominada de “flowthrough” (FT). Esse FT foi aplicado na coluna Q Sepharose FF (VC = 45,6 mL) em diferentes condições, com objetivo de purificar a IgM, separando-a das duas proteínas mais abundantes do plasma, a albumina e a IgG. O fluxograma geral da Estratégia 2 está mostrado na Figura 13.

Foram realizados os testes de dosagem de proteínas totais pelo método de Bradfor e análise do perfil de proteínas por SDS-PAGE. Também foi feita a análise da presença de IgM, IgG e IgA por western blot e a quantificação de cada imunoglobulina por turbidimetria.

Ambas as colunas utilizadas nessa estratégia, ANX Sepharose FF e Q Sepharose FF, foram lavadas após cada experimento com NaOH 1 M, NaCl 2M e água e armazenada com NaOH 0,2 M.

Ambas as colunas utilizadas nessa estratégia, ANX Sepharose FF e Q Sepharose FF, foram lavadas após cada experimento com NaOH 1 M, NaCl 2M e água e armazenada com NaOH 0,2 M.

Figura 13 – Fluxograma geral da Estratégia 2, utilizada para purificação de IgM.

4.4.1 Purificação de plasma em ANX Sepharose FF

Para purificação do plasma, equilibramos a coluna ANX Sepharose FF com tampão citrato 25 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 85 mM, pH 6,0, condutividade 13 mS/cm. Aplicamos 10 VC de plasma em pH 6,0 e eluimos as proteínas adsorvidas com tampão citrato 25 mM, CaCl_2 5 mM, NaCl 500 mM, pH 6,0, condutividade 49 mS/cm.

4.4.2 Purificação do FT/ANX em Q Separose FF

O FT da purificação em ANX Sepharose FF foi aplicado na coluna Q Sepharose FF. Foram utilizados diferentes condições experimentais de adsorção e dessorção das proteínas, apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Condições experimentais empregadas nos experimentos na coluna Q Sepharose FF – Estratégia 2.

Experimento	Amostra aplicada (mg)	Diluição	Gradiente	Tampões utilizados	pH	Condutividade (mS/cm)
1	1663	17 x	pH 8,0, 6,0, 4,5, 4,0 e 4,0 com NaCl 1M	Tris-HCl 20 mM	8,0	0,965
				Acetato de sódio 40 mM	6,0	3,23
					4,5	3,23
					4,0	3,23
				Acetato de sódio 40 mM, NaCl 1M	4,0	87,2
2	222	10 x	pH 8,0, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0 e 4,0 com NaCl 500 mM	Tris-HCl 100 mM	8,0	5,29
				Bis-Tris 100 mM	7,0	7,78
					6,5	4,24
					6,0	6,15
					5,5	7,15
				Acetato de sódio 100 mM	5,0	7,36
					4,5	7,26
					4,0	7,09
3	163	10 x	pH 6,0, 5,5, 5,0, 4,0	Acetato de sódio 100 mM, NaCl 500 mM	4,0	49,3
				Citrato 4 mM	6,0	0,968
				Acetato de sódio 20 mM	5,5	1,68
					5,0	1,69
					4,0	1,70
4	200	10 x	NaCl 0 - 500 mM	Citrato 4 mM, pH 6,0,	6,0	0,940
				Acetato de sódio 20 mM	6,0	1,72
				Acetato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM	6,0	48,1
5	168	10x	pH 8,0 a pH 5,5 pH 5,5 NaCl 300 mM pH 5,5 NaCl 500 mM	Tris-HCl 100 mM	8,0	4,96
				Acetato de sódio 100 mM	5,5	7,50
					5,5	36,1
					5,5	53,3
6	178	10x	pH 8,0 a pH 5,5 pH 5,5 NaCl 300 mM pH 5,5 NaCl 500 mM	Acetato de sódio 70 mM	8,0	5,49
				Acetato de sódio 100 mM	5,5	7,63
					5,5	36,1
					5,5	53,4
7	1572	10 x	pH 8,0 a pH 5,5 pH 5,5 NaCl 300 mM pH 5,5 NaCl 500 mM	Acetato de sódio 70 mM	8,0	5,44
				Acetato de sódio 100 mM	5,5	7,63
					5,5	36,1
					5,5	53,4

4.4.3 Separação de IgM e IgA por Sepharose 4 FF

Vinte mililitros da fração eluída com tampão Acetato de sódio 100 mM, NaCl 300 mM, pH 5,5 do experimento 7 foram aplicados na coluna Sepharose 4 FF, XK 26/70 (VC = 301,78 mL) na tentativa de separar a IgM das demais proteínas menores. Foi feito o recolhimento da eluição em frações de 10 mL. Para equilíbrio e eluição da coluna Sepharose 4 FF foi utilizado o tampão Acetato de sódio 100 mM, NaCl 300 mM, pH 5,5, condutividade 36,1 mS/cm.

A coluna foi lavada com 2 VC de NaOH 1 M e 5 VC de água. A coluna foi armazenada em NaOH 20 mM. O equipamento foi sanitizado com NaOH 0,5 M e água.

Foram realizados os testes de dosagem de proteínas totais pelo método de Bradfor e análise do perfil de proteínas por SDS-PAGE. Também foi feita a análise da presença de IgM e IgA por western blot.

4.4.4 Separação de IgM e IgA por gel filtração Sephacryl S-300

A fração eluída com tampão Acetato de sódio 100 mM, NaCl 300 mM, pH 5,5 do experimento 7 descrito na Tabela 4 também foi aplicada na coluna Sephacryl S-300, XK 26/70 (VC = 328,6 mL) na tentativa de separar a IgM das demais proteínas menores. Foi aplicado 2% de amostra em relação ao volume da coluna. Foi feito o recolhimento da eluição em frações de 1 mL. Para equilíbrio e eluição da coluna Sephacryl S-300 foi utilizado o tampão Acetato de sódio 100 mM, NaCl 300 mM, pH 5,5, condutividade 36,1 mS/cm.

A coluna foi lavada com 2 VC de NaOH 0,2 M e 5 VC de água. O equipamento foi sanitizado com NaOH 0,5 M e água.

Foram feitas a análise do perfil de proteínas por SDS-PAGE e a análise da presença de IgM e IgA por western blot.

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford

A determinação da concentração protéica total das frações obtidas nos experimentos foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Para curva de calibração a concentração de BSA variou de 2 a 20 mg/mL. Ao volume de 50 μ L das diluições de cada ponto da curva foram adicionados 200 μ L do reagente de Bradford.

As amostras foram diluídas, quando necessárias, com NaCl 0,9% (m/v). Ao volume de 50 μ L de cada amostra foram adicionados 200 μ L do reagente de Bradford.

A leitura foi realizada no Leitor de microplacas SPECTRA max 340 PC, no comprimento de onda de 595 nm.

A equação da reta da curva de calibração permitiu o cálculo da quantidade de massa de proteína nas frações das purificações. A massa de proteína em cada fração é calculada considerando a diluição usada na dosagem e o volume total da fração.

4.5.2 Dosagem de IgM, IgG e IgA por turbidimetria

Para a dosagem de IgM, IgG e IgA foi utilizado o padrão Topkal Multi Turbi. Com base na concentração específica de cada proteína indicada no manual do fabricante construímos a curva de calibração para cada teste. Para a curva de calibração do teste para IgM adaptamos os pontos para a curva de calibração: 1:10, 1:15, 1:20, 1:40, 1:80. Para construção da curva de calibração dos testes de dosagem de IgG e IgA seguimos as instruções do fabricante: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160.

Foi realizada uma adaptação para utilização de microplaca, ao invés de cubeta, como indicado pelo fabricante. Diminuimos o volume, mantendo a proporção dos componentes do teste. Para a dosagem de IgM, foi utilizado 12 μ L de amostra e 200 μ L do reagente IgM Mono. Para a dosagem de IgG, foi utilizado 1,6 μ L de amostra e 200 μ L do reagente IgG Mono. Para a dosagem de IgA, foi utilizado 3,2 μ L de amostra e 200 μ L do reagente IgG Mono. Após a mistura da amostra com o

reagente, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. A leitura da placa foi realizada em Leitor de Microplaca, no comprimento de onda de 340 nm.

Em alguns casos concentramos as amostras utilizando o aparelho Centrivap. Secamos as amostras e ressuspendemos com NaCl 0,9%.

4.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo o protocolo descrito por Laemmli (1970). O gel de separação foi feito a uma concentração de 12% (v/v), com 1 mm de espessura. Após polimerização deste gel, foi aplicado sobre este, o gel de empilhamento 4% (v/v).

As amostras para o gel em condições redutoras e desnaturantes foram preparadas utilizando tampão de amostra 5 vezes concentrado, ficando no final 1 vez. O tampão de amostra utilizado foi: Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, azul de bromofenol 0,1% (m/v), glicerol 10% (v/v), SDS 2% (m/v), β -mercaptoetanol 100 mM. Após essa mistura, as amostras foram aquecidas a 96 °C, por aproximadamente 10 minutos. Algumas amostras foram concentradas para aplicar no gel. Para isso, 200 μ L da amostra foi misturada com 800 μ L de acetona. Essa mistura foi mantida no freezer por 10 minutos e centrifugada por 10 minutos a 7000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet com as proteínas precipitadas foi ressuspendido com tampão de amostra 1 x.

As amostras foram aplicadas ao gel e a corrida foi realizada a uma tensão de 140 V, utilizando tampão de corrida Tris-Glicina (tampão Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%, pH8,3).

O padrão de massa molecular utilizado foi Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas/ Thermo Scientific) ou PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas/ Thermo Scientific).

Os géis foram corados sob agitação com corante à base de Coomassie Brilliant Blue por 24 horas, sendo depois descorados com água purificada ou descorante até as bandas de proteínas ficarem visíveis:

- Corante 1: sulfato de amônio 10%, ácido fosfórico 10%, metanol 20%, Coomassie G250 0,12%.
- Corante 2: sulfato de alumínio 5%, ácido fosfórico 2%, etanol 10%, Coomassie G250 0,02%.

- Descorante: etanol 10%, ácido fosfórico 2%, água.

4.5.4 Análise da presença de IgM, IgG e IgA por western blot

Para avaliar a presença de IgM, IgG e IgA nas amostras das purificações, foi realizado western blot para essas proteínas específicas. Iniciou-se com uma eletroforese convencional, como descrito no item 4.5.3 e após a corrida o gel foi colocado em contato com uma membrana de PVDF para transferência das proteínas. A transferência foi realizada pela passagem de corrente elétrica de 400 mA por duas horas e meia, utilizando tampão Tris 25 mM, pH 8,0, contendo glicina 192 mM, SDS 0,02% e Etanol 20%. Para avaliar a transferência, as membranas foram coradas com solução de Ponceau (Ponceau S 0,5%, ácido acético glacial 10 % e água purificada). As membranas foram lavadas com água e bloqueadas com solução TBS-T (Solução basal: Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, com Tween 20 0,05%) com 10% de leite em pó desnatado e 1% de BSA. O bloqueio foi feito por aproximadamente 2 horas para as membranas que foram incubadas com apenas 1 anticorpo já conjugado com peroxidase e overnight para membranas em que foi utilizado o primeiro e o segundo anticorpo. Todas as incubações de bloqueio e com anticorpos e todas as lavagens foram feitas em temperatura ambiente, sob agitação.

Para detecção da presença de IgM foram utilizados 2 protocolos diferentes: **(1)** Para o experimento de Mapeamento de albumina, IgM e IgG nas amostras da purificação em Sepharose 4 FF e para o experimento realizado com a membrana Sartobind Q: após o bloqueio, as membranas foram incubadas “overnight”, com solução TBS-T com 10% de leite em pó desnatado, contendo o primeiro anticorpo, IgM (R1/69) (Santa Cruz Biotechnology), na diluição de 1:1000. As membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos cada com solução de TBS-T. A membrana foi incubada 2 horas com o segundo anticorpo ImmunoPure® Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L), Peroxidase Conjugated (Pierce) diluído 1:5000 em solução TBS-T com 10% de leite em pó desnatado; **(2)** Para os demais experimentos: após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo Peroxidase-Labeled Affinity Purified Antibody to Human IgM (μ) – (KPL), diluído 1:2000, por 2 horas.

Para a detecção da presença de IgG, após o bloqueio, as membranas foram incubadas por 2 horas com o anticorpo conjugado a peroxidase ImmunoPure® Goat

Anti-Human IgG (H+L), Peroxidase Conjugated (Pierce), diluídos 1:2000 ou 1:1000 em solução TBS-T com 10% de leite em pó desnatado.

Para a detecção da presença de IgA, após o bloqueio, as membranas foram incubadas “overnight” com o anticorpo Goat anti-human IgA (Sigma) diluídos 1:2000 em solução TBS-T com 10% de leite em pó desnatado. A membrana foi lavada 3 vezes de 10 minutos cada com solução de TBS-T. Após a lavagem, a membrana foi incubada 2 horas com o segundo anticorpo Rabbit anti-goat IgG peroxidase (Sigma).

Após a incubação com os anticorpos, tanto para membranas de IgM quanto para membranas de IgG e IgA, foram lavadas 3 vezes de 10 minutos cada com solução de TBS-T.

Para relevação da membrana foi utilizado o kit SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) que contém as soluções SuperSignal West Pico Luminol/Enhancer Solution e SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution. Foi misturado 1 mL de cada uma dessas soluções para cada membrana e incubadas por 5 minutos. A membrana foi exposta para revelação no equipamento EL Logic 2200 Imagine System, controlado pelo programa Carestream, por cerca de 5 minutos.

O padrão de massa molecular utilizado foi PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas/ Thermo Scientific) ou Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers (GE Healthcare).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram desenvolvidas duas estratégias para purificação de IgM (Figuras 12 e 13).

A primeira estratégia foi escolhida com base no processo desenhado pela GE Healthcare para a fábrica de Hemoderivados do Instituto Butantan, para a produção de FVIII, FIX, albumina e IgG. A primeira coluna deste processo é a coluna de gel filtração Sepharose 4 FF, a partir da qual são coletadas 4 frações principais e apenas 2 são utilizadas, a primeira para a produção de FVIII e a terceira para a produção das demais proteínas. Neste trabalho desenvolvemos um método de purificação de IgM a partir da segunda fração desta coluna, fração esta que seria descartada no processo da fábrica.

A segunda estratégia faz parte de um processo que vem sendo desenvolvido no laboratório em que o plasma é diretamente aplicado a uma coluna de troca aniônica e fatores de coagulação são separados, e 99% das proteínas presentes, em massa, são recolhidas no FT. Neste trabalho desenvolvemos a purificação de IgM a partir do FT da coluna ANX Sepharose FF.

Em todas as purificações foram acompanhadas a presença de IgM e de albumina e imunoglobulinas G e A nas frações. A albumina, por ser a proteína mais abundante do plasma, afeta a pureza final do produto e a composição de imunoglobulinas de diferentes classes, embora não se tenha uma legislação clara sobre os limites permitidos, o conhecimento da sua composição é importante.

5.1 Estratégia 1

A estratégia 1 iniciou-se com o mapeamento de IgM na coluna de gel filtração Sepharose 4 FF. A fração enriquecida de IgM, Fração 2, foi novamente purificada em coluna de troca aniônica, uma vez que é conhecido da literatura que a IgM liga-se fortemente a esse tipo de coluna e que possibilita a separação de IgG (TANAKA et al., 2000). Foram testadas 4 diferentes colunas: Q Sepharose FF, ANX Sepharose FF, coluna monolítica QA e membrana Sartobind Q. Finalmente, foi testada uma coluna de afinidade a cobalto (IMAC-Co²⁺), para a purificação da Fração 2 e do eluato da coluna de troca aniônica, uma vez que as imunoglobulinas apresentam resíduos de histidina em sua superfície.

5.1.1 Mapeamento de IgM na coluna Sepharose 4 FF

A estratégia 1 iniciou-se com a aplicação de plasma na coluna de gel filtração Sepharose 4 FF. Para o mapeamento foram recolhidos 34 tubos de 10 mL (Figura 14). A concentração de proteína em cada tubo foi determinada pelo método de Bradford e o resultado está mostrado na Tabela 5 e no detalhe da Figura 14.

Figura 14 - Cromatograma da purificação de plasma em coluna Sepharose 4FF.

O plasma foi aplicado à coluna Sepharose 4FF e os tubos foram recolhidos a cada 10 ml, com total de 34 tubos para o mapeamento de IgM. Após o mapeamento, o recolhimento foi simplificado para 4 frações. A detecção foi feita em UV 280 nm. Em detalhe encontra-se o gráfico representativo da dosagem de proteína nas frações por Bradford.

A presença de albumina foi analisada por gel de poliácridamida 12% (Figura 15). Observando a banda de 66 kDa, consideramos que esta proteína está presente principalmente entre os tubos 14 a 27. Os resultados de western blot indicam que a IgM encontra-se majoritariamente entre os tubos 5 a 15 (Figura 16) e a IgG entre os tubos 14 e 27 (Figura 17). Com base nestes resultados, para a purificação de IgM, foram coletadas 4 frações da purificação em coluna Sepharose 4FF. A fração 1, com o conteúdo dos tubos 1 a 4, contém as proteínas de alta massa molecular do plasma, como o FVIII e fator de von Willebrand. A fração 2, contém o

correspondente ao pool das frações 5 a 15, utilizada para continuar a purificação de IgM. A fração 3, correspondente ao conteúdo formado pelo pool das frações 16 a 29, contém a maior parte das proteínas do plasma, incluindo as mais abundantes: albumina e IgG. A fração 4, formado a partir do pool das frações 30 a 34, contém as demais proteínas do plasma.

Tabela 5 - Concentração de proteínas nos tubos da purificação de plasma em Sepharose 4FF.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
Plasma	65	94,77	6160
Tubo 1	10	0,02	0,17
Tubo 2	10	0,16	1,58
Tubo 3	10	0,12	1,21
Tubo 4	10	0,17	1,66
Tubo 5	10	0,23	2,31
Tubo 6	10	0,35	3,52
Tubo 7	10	0,46	4,59
Tubo 8	10	0,58	5,82
Tubo 9	10	0,78	7,83
Tubo 10	10	1,31	13,09
Tubo 11	10	1,91	19,07
Tubo 12	10	2,83	28,25
Tubo 13	10	4,79	47,93
Tubo 14	10	7,49	74,92
Tubo 15	10	11,13	111
Tubo 16	10	21,50	215
Tubo 17	10	33,86	338
Tubo 18	10	55,30	553
Tubo 19	10	66,12	661
Tubo 20	10	74,52	745
Tubo 21	10	76,58	765
Tubo 22	10	71,61	716
Tubo 23	10	62,68	626
Tubo 24	10	52,04	520
Tubo 25	10	28,19	281
Tubo 26	10	15,84	158
Tubo 27	10	5,65	56,51
Tubo 28	10	1,33	13,29
Tubo 29	10	0,42	4,23
Tubo 30	10	0,21	2,06
Tubo 31	10	0,11	1,13
Tubo 32	10	0,07	0,66
Tubo 33	10	0,08	0,78
Tubo 34	10	0,07	0,71

Figura 15 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras dos tubos obtidos na purificação de plasma em Sepharose 4FF.

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular, Plasma (0,6 μ L), Tubos 1 a 11 (12 μ L), Tubos 12 a 27 (0,6 μ L), Tubos 28 a 34 (12 μ L).

Figura 16 - Análise da presença de IgM nos tubos obtidos na purificação de plasma em Sepharose 4FF por western blot.

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular, Plasma (0,8 μ L), Tubos 1 a 7 (16 μ L), Tubos 8 a 16 (1,6 μ L), Tubos 17 a 27 (0,8 μ L), Tubos 28 a 34 (16 μ L).

Figura 17 - Análise da presença de IgG nos tubos obtidos na purificação de plasma em Sepharose 4FF por western blot.

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular, Plasma (0,12 μ L), Tubos 1 a 10 (12 μ L), Tubos 11 a 28 (0,15 μ L), Tubos 29 (12 μ L), Tubos 30 a 34 (0,6 μ L).

5.1.2 Análise das frações da coluna Sepharose 4 FF

Para a caracterização das frações, foram realizadas sequencialmente 5 corridas e coletadas as 4 frações de cada uma. As frações correspondentes das 5 corridas foram reunidas e analisadas.

A concentração de IgM, IgG e IgA nas frações, determinadas pelo método turbidimétrico estão mostrados nas tabelas 6, 7 e 8. A concentração de proteína nas frações, obtida pelo método de Bradford, é mostrada na Tabela 9.

Os resultados apresentados mostram que 63,7% de IgM foi recuperada na Fração 2, com fator de purificação de 8 vezes em relação ao plasma. A perda de IgM nas demais frações foi de 34,2%. Nessa fração está presente 11,9% da IgG e 18,7% da IgA. Por serem menores, estas imunoglobulinas foram recuperadas principalmente na Fração 3.

Tabela 6 – Dosagem de IgM nas frações da purificação de plasma em Sepharose 4FF.

Amostras	Volume (ml)	Concentração IgM (mg/mL)	IgM Total (mg)	Recuperação (%)	Proteína total (mg)	Conteúdo específico (mg IgM/ mg proteína)	Fator de purificação
Plasma	300	0,84	252,75	100	16438	0,02	-
Fração 1	165	0,02	2,76	1,1	5	0,51	-
Fração 2	600	0,27	161,10	63,7	1237	0,13	8
Fração 3	570	0,15	83,65	33,1	10140	0,01	1
Fração 4	250	-0,03	-	-	38	-	-

Tabela 7 – Dosagem de IgG nas frações da purificação de plasma em Sepharose 4FF.

Amostras	Volume (ml)	Concentração IgG (mg/mL)	IgG Total (mg)	Recuperação (%)
Plasma	300	3,53	1058	100
Fração 1	165	-0,47	-	-
Fração 2	600	0,21	125	11,9
Fração 3	570	1,54	876	82,8
Fração 4	250	-0,41	-	-

Tabela 8 – Dosagem de IgA nas frações da purificação de plasma em Sepharose 4FF.

Amostras	Volume	Concentração IgA (mg/mL)	IgA Total (mg)	Recuperação (%)
Plasma	300	3,01	902	100
Fração 1	165	0,02	3	0,3
Fração 2	600	0,28	168	18,7
Fração 3	570	0,94	536	59,4
Fração 4	250	0,30	76	8,4

Tabela 9 – Concentração de proteína nas frações da purificação de plasma em Sepharose 4FF.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)
Plasma	300	54,8	16437
Fração 1	165	0,0	5,4
Fração 2	600	2,1	1237
Fração 3	570	17,8	10140
Fração 4	250	0,2	38,4

Na tabela 10 observa-se que a porcentagem, em massa, de imunoglobulinas (IgM, IgG e IgA) é de 35%, indicando a necessidade de pelo menos mais uma etapa de purificação para obter uma pureza maior da IgM. O produto comercial Pentaglobin[®] contém 95% de imunoglobulinas do total de proteínas presentes na formulação final.

Tabela 10 – Recuperação de imunoglobulinas na Fração 2 da purificação de plasma em Sepharose 4FF.

	Conteúdo na Fração 2 (mg)	Recuperação (%)
Proteína Total	1237	100,0
IgM	161	13,0
IgG	126	10,2
IgA	150	12,1
Total de imunoglobulinas	437	35,3

A análise por SDS-PAGE e western blot das imunoglobulinas analisadas estão mostradas na Figura 18. O resultado da análise por western blot mostra que a IgM está presente na Fração 2 (Figura 18B). Por outro lado, a IgG e a IgA foram observadas em todas as frações, principalmente nas Frações 2 e 3 (Figura 18C e 18D). Embora nos western blots a intensidade das bandas estejam mais intensas na Fração 2, é importante observar que a amostra da Fração 3 foi diluída 20 vezes, enquanto a Fração 2 não foi diluída. Com base em cálculos feitos a partir dos resultados obtidos por turbidimetria, o conteúdo de IgG aplicado nos géis é de 3,2 μg na Fração 2 e 1,2 μg na Fração 3. Em relação a IgA, a Fração 2 contém 4,2 μg , enquanto a Fração 3 contém 0,71 μg . Portanto, os resultados obtidos pelo western blot estão de acordo com os resultados observados no teste turbidimétrico.

Figura 18 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA nas frações obtidas na purificação de plasma em Sepharose 4FF por western blot.

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular, Plasma (33 μg), 1. Fração 1 (0,4 μg), 2. Fração 2 (25 μg), 3. Fração 3 (10,7 μg), 4. Fração 4 (1,8 μg), Padrão IgM (0, 2 μg), Padrão IgG (20 μg); **(C)** Padrão IgG (2,4 μg). O plasma e a Fração 3 foram diluídos 20x e as demais frações foram aplicadas sem diluição.

A etapa seguinte de purificação de IgM utilizada neste trabalho consistiu em utilizar colunas de troca aniônica ou IMAC-Co²⁺ para a separação de IgM das demais proteínas.

5.1.3 Purificação da Fração 2/ 4FF em coluna Q Sepharose FF

Para iniciar nossos estudos, aplicamos a Fração 2 da purificação em Sepharose 4 FF na coluna Q Sepharose FF e fizemos um gradiente linear de NaCl de 0 a 500 mM e uma lavagem final com NaCl 1 M. O perfil cromatográfico dessa purificação pode ser observado na Figura 19. O gradiente linear foi recolhido em alíquotas de 50 ml.

A análise de IgM das frações por western blot mostra que praticamente toda IgM pode ser recuperada com NaCl de 361 mM (Figura 20).

Figura 19 – Cromatograma da purificação da Fração 2/4FF em Q Sepharose FF, com eluição em gradiente linear.

A Fração 2/4FF foi aplicada à coluna Q Sepharose FF e foi realizado um gradiente linear de NaCl de 0 a 500 mM e uma lavagem final com NaCl 1M. O gradiente linear foi recolhido em frações de 50 ml. A detecção foi feita em UV 280 nm.

Figura 20 - Análise da presença de IgM nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF em Q Sepharose FF, com eluição em gradiente linear.

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular, Fração 2/ 4FF, FT, 39 mM, 95,5 mM, 158 mM, 225 mM, 295 mM, 361mM, 1M. Foram aplicados 16 μ l das amostras sem diluição. A molaridade indica a concentração média de NaCl que as frações foram eluídas no gradiente linear.

Com base no resultado obtido no western blot, estabelecemos para a coluna Q Sepharose FF um protocolo com gradiente em degrau, com eluição de IgM em NaCl 350 mM. Após a aplicação da Fração 2 da Sepharose 4FF e lavagem das proteínas não adsorvidas com tampão de equilíbrio (Reequilíbrio), foi feita uma lavagem com NaCl 200 mM, seguida de eluição com NaCl 350 mM e uma última lavagem com NaCl 500 mM. O cromatograma desta purificação pode ser observado na Figura 21. As análises do conteúdo proteico por Bradford e do perfil proteico por gel de poliacrilamida das frações coletadas estão mostradas na Tabela 11 e Figura 22A, respectivamente. A análise de IgM, IgG e IgA nas frações coletadas foram feitas por western blot e turbidimetria (Figura 22 e Tabela 12).

A análise por turbidimetria indica que 55% da IgM foi recuperada na fração 350 mM-A, com fator de purificação 6 (Tabela 12). Na análise por western blot (Figura 22B) a IgM está presente no FT, na fração 200 mM e em maior concentração na fração 350 mM-A. Esta diferença nos resultados pode ser explicada pela diferença de sensibilidade dos 2 métodos. O limite de detecção de IgM pelo método turbidimétrico é de 40 μ g/mL, enquanto que o método de detecção do western blot por ECL tem sensibilidade da ordem de ng/mL.

A IgG foi somente observada no FT por western blot (Figura 22C), indicando que nas condições experimentais empregadas, a IgG não é adsorvida na coluna.

Pelo método turbidimétrico não foi possível detectar a presença de IgG nas frações, possivelmente devido à menor sensibilidade do método. O limite de detecção de IgG é de 0,8 mg/mL.

Por western blot, a presença de IgA foi observada nas mesmas frações da IgM, isto é, FT, 200 mM e 350 mM-A (Figura 22D). Também não foi possível dosar a IgA por turbidimetria possivelmente também devido à baixa concentração desta proteína nas frações coletadas.

Figura 21 - Cromatograma da purificação da Fração 2/ 4FF em Q Sepharose FF.

A Fração 2/4FF foi aplicada à coluna Q Sepharose FF e foi realizado um gradiente em step de NaCl. A detecção foi feita em UV 280 nm. As frações coletadas foram denominadas FT, Reequilíbrio, 200 mM, 350 mM e 500 mM.

Tabela 11 – Concentração de proteína nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF, em Q Sepharose FF.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de proteína (mg/ml)	Proteína Total (mg)
Fração 2/ 4 FF	40	2,54	101,7
FT	177	0,37	65,9
Reequilíbrio	319	0,00	1,3
200 mM	228	0,04	8,1
350 mM-A	137	0,07	9,7
350 mM-B	91	0,01	0,5
500 mM	228	0,00	-

Tabela 12 – Dosagem de IgM nas frações da purificação da Fração 2/4FF em Q Sepharose FF.

Amostras	Volume (ml)	Concentração IgM (mg/mL)	IgM Total (mg)	Recuperação (%)	Proteína total (mg)	Conteúdo específico (mg IgM/ mg proteína)	Fator de purificação
Fração 2/4 FF	40	0,29	11,54	100	101,7	0,11	-
FT	177	0,01	-	-	65,9	-	-
Reequilíbrio	319	0,00	-	-	1,3	-	-
200 mM	228	0,00	-	-	8,1	-	-
350 mM-A	137	0,05	6,33	55	9,7	0,65	6
350 mM-B	91	0,02	-	-	0,5	-	-
500 mM	228	0,03	-	-	-	-	-

Figura 22 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA das frações obtidas na purificação de IgM em Q Sepharose FF.

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular, Fração 2/ 4FF (30,5 µg), FT (4,5µg), Reequilíbrio (0,05 µg), 200 mM (0,43 µg), 350 mM-A (0,85 µg), 350 mM-B (0,06 µg), Padrão IgM (2 µg), Padrão de IgG (4 µg); **(C)** Padrão de IgG (2,4 µg). As frações apresetam massa diferente, pois foi aplicado um volume constante em todas as frações.

Os resultados apresentados mostram que, nas condições experimentais empregadas, a IgM é adsorvida na coluna Q Sepharose FF e a IgG não, indicando que a IgM liga-se mais fortemente à coluna de troca aniônica que a IgG. Por outro lado, a presença de IgA foi observada nas mesmas frações em que foi observada a presença de IgM, indicando que estas proteínas tem afinidade semelhante à coluna Q Sepharose FF. Resultado semelhante foi observado por Tanaka et al. para a purificação de IgG em Q Sepharose FF (2000), embora as condições de pH e condutividade empregadas tenham sido diferentes. Em seus experimentos, Tanaka et al. empregaram tampão acetato de sódio 20 mM, pH 6,0, que apresentava a condutividade de 1,4 mS/cm, enquanto o tampão empregado neste trabalho foi tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,1, que apresentava a condutividade de 18 mS/cm. Quanto menor a condutividade, mais fortemente as proteínas são adsorvidas à coluna. Por outro lado, em coluna de troca aniônica, quanto maior o pH, mais fortemente as proteínas são adsorvidas à coluna. Portanto, tanto para a IgG como para a IgM a variação dos 2 fatores acabaram se compensando e nas 2 condições experimentais a IgG não foi adsorvida e a IgM foi adsorvida à coluna.

5.1.4 Purificação da Fração 2/ 4FF em coluna monolítica QA

A coluna monolítica foi testada para esta purificação porque a sua construção favorece a purificação de moléculas grandes, na medida em que o deslocamento dentro da coluna é somente por convexão e não por difusão e convexão, como ocorre nas colunas do tipo “bead”.

A Fração 2 da coluna Sepharose 4FF foi dessalinizada na coluna Sephadex G25 e aplicada na coluna monolítica. As proteínas foram eluídas em gradiente linear de de NaCl de 0 a 1 M. O perfil cromatográfico está mostrado na Figura 23A, com uma ampliação da área do pico na Figura 23B, mostrando as frações coletadas.

Na tabela 13 estão apresentados os resultados obtidos nas análises da concentração de proteínas e na Figura 24A o gel de poiliacrilamida das amostras coletadas. Todas as proteínas da amostra foram adsorvidas à coluna, devido à baixa condutividade da amostra de entrada e foram eluídas com concentração de sal menor que 500 mM.

Figura 23 - Cromatograma da purificação da Fração 2/4FF em QA Monolito.

(A) Cromatograma da purificação da Fração 2/ 4FF em QA Monolito; (B) Ampliação da área do gradiente linear. A detecção foi feita em UV 280 nm. As frações coletadas a cada 5 mL.

Tabela 13 - Concentração de proteínas nas frações da purificação da Fração 2 /4FF, em coluna monolítica QA.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
Fração 2/4FF dessalinizada	50	0,71	35,59
FT	49	0,00	-
Reequilíbrio	160	0,00	-
Fração 1	5	0,01	0,03
Fração 2	5	0,08	0,42
Fração 3	5	1,31	6,56
Fração 4	5	1,16	5,80
Fração 5	5	0,89	4,47
Fração 6	5	0,37	1,84
Fração 7	5	0,08	0,40
Fração 8	5	0,04	0,21
Fração 9	5	0,02	0,12
Fração 10	5	0,02	0,09
Fração 11	5	0,01	0,06
Fração 12	5	0,01	0,04
Fração 13	5	0,00	0,02
Fração 14	5	0,00	0,01
Fração 15	5	0,00	0,01
Fração 16	5	0,00	-

Na análise por western blot, pode ser observado que a IgM começa a ser detectada a partir da fração 4 do gradiente linear (NaCl 225 mM) , sendo as bandas

mais intensas nas frações 6 e 7 (Figura 24B). A fração 6 corresponde a 361 mM de NaCl, indicando que podemos recuperar a IgM com NaCl 350 mM. A IgG liga-se mais fracamente à coluna e a sua banda pode ser observada a partir das primeiras frações do gradiente linear, e a intensidade vai diminuindo ao longo das frações (Figura 24C). Os resultados obtidos com a coluna monolítica são semelhantes aos obtidos com a coluna Q, em que a IgM liga-se à coluna mais fortemente que a IgG e pode ser eluída da coluna com NaCl 350 mM.

Em estudos realizados por Breen et al., (2012) e Brne et al., (2007), observa-se que com utilização de coluna monolítica do tipo QA, a IgG é recuperada no FT, enquanto que a IgM é recuperada no gradiente de NaCl, o que está de acordo com nossos resultados obtidos com a coluna Q Sepharose FF. A presença de IgG na fração eluída com sal e não no FT neste experimento com a coluna monolítica pode ser explicada pela baixa condutividade da amostra de entrada da coluna.

Embora o resultado encontrado para a purificação tenha sido semelhante ao observado com a coluna Q Sepharose FF, não foi possível continuar o estudo com esta coluna porque ela rachou, mostrando ser um produto muito frágil.

Figura 24 - Gel de poliacrilamida 12 % em condições redutoras (A) e análise da presença de IgM (B) e IgG (C) nas frações obtidas na purificação de IgM em coluna monolítica QA.

A concentração média de NaCl nos tubos é de tubo 2 = 95,5 mM, tubo 3 = 158 mM, tubo 4 = 225 mM, tubo 5 = 295 mM, tubo 6 = 361 mM, tubo 7 = 42,75 mM, tubo 8 = 492 mM, tubos 9 a 16 correspondem a parte do gradiente linear entre NaCl 500 mM e 1M. Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular,

(A) Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras. Fração 2/ 4FF (42,72 µg), G25 (8,52 µg), 1. Tubo 1 (0,12 µg), 2. Tubo 2 (0,96 µg), 3. Tubo 3 (15,72 µg), 4. Tubo 4 (13,92 µg), 5. Tubo 5 (10,68 µg), 6. Tubo 6 (4,44 µg), 7. Tubo 7 (0,96 µg), 8. Tubo 8 (0,48 µg), 9. Tubo 9 (0,24 µg), 10. Tubo 10 (0,24 µg), 11. Tubo 11 (0,12 µg), 12. Tubo 12 (0,12 µg).

(B) Análise de western blot de IgM. Fração 2/ 4FF (56,96 µg), G25 (11,36 µg), Tubo 2. (1,28 µg), Tubo 3. (20,96 µg), Tubo 4. (18,56 µg), Tubo 5. (14,24 µg), Tubo 6. (5,92 µg), Tubo 7. (16 µL), Tubos 8-16. (0,16 µg);

(C) Análise de western blot de IgG. Fração 2/ 4FF (56,96 µg), G25 (11,36 µg), Tubo 2. (1,28 µg), Tubo 3. (20,96 µg), Tubo 4. (18,56 µg), Tubo 5. (14,24 µg), Tubo 6. (5,92 µg), Tubos 7 a 16. (0,16 µg), Padrão de IgG (8 ng).

As frações apresetam massa diferente, pois foi aplicado um volume constante em todas as frações.

5.1.5 Purificação da Fração 2/4FF em membrana Sartobind Q Nano

A membrana Sartobind Q Nano foi testada porque favorece a purificação de moléculas de tamanho grande pela mesmas razões que a coluna monolítica. Nela as proteínas deslocam-se apenas por convexão.

A Fração 2 da Sepharose 4 FF foi diretamente aplicada à membrana e as proteínas adsorvidas foram submetidas às mesmas condições de lavagem e eluição determinadas para a coluna Q Sepharose FF, isto é, NaCl 200 mM, 350 mM e 500 mM.

O perfil cromatográfico desta purificação é bastante semelhante ao obtido com a Q Sepharose FF, isto é, pode-se observar um pico no FT e um outro na fração eluída com NaCl 350 mM (Figura 25), que contém apenas 7,8% em massa das proteínas recuperadas (Tabela 14).

Figura 25 - Cromatograma da purificação da Fração 2/4FF em membrana Sartobind Q Nano.

A Fração 2/ 4FF foi aplicada diretamente na membrana Sartobind Q Nano. A detecção foi feita em UV 280 nm. As frações coletadas foram denominadas FT, Reequilíbrio, 200 mM-A, 200 mM-B, 350 mM-A, 350 mM-B e 500 mM.

Tabela 14 - Concentração de proteínas nas frações da purificação da Fração 2/4FF em membrana Sartobind Q Nano.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
Fração 2/ 4FF	12	2,89	34,73
FT	36	0,69	25,22
Reequilíbrio	21	0,01	0,26
200 mM - A	19	0,03	0,56
200 mM - B	31	0,01	0,36
350 mM - A	14	0,15	2,26
350 mM - B	25	0,01	0,22
500 mM	30	0,00	0,01

Através da análise dos resultados de western blot, observa-se que a IgM encontra-se na fração 350 mM-A (Figura 26B), enquanto que a IgG está predominantemente no FT e apenas uma leve banda da cadeia pesada de IgG é observada na fração que contém IgM (Figura 26C).

Figura 26 - Gel de poliacrilamida 12 % em condições redutoras (A) e análise da presença de IgM (B) e IgG (C) nas frações obtidas na purificação de IgM em membrana Sartobind Q Nano.

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular; Fração 2/ 4FF (46,24 µg), FT (11,04 µg), Reequilíbrio (0,16 µg), 200 mM-A (0,48 µg), 200 mM-B (0,16 µg), 350 mM-A (2,4 µg), 350 mM-B (0,16 µg).

(A) Plasma (43,74 µg), Fração 2/ 4FF (34,68 µg), FT (8,28 µg), Reequilíbrio (0,12 µg), 200 mM-A (0,36 µg), 200 mM-B (0,12 µg), 350 mM-A (1,8 µg), 350 mM-B (0,12 µg);

(B) Plasma (58,34 µg).

(C) Plasma (11,6 µg).

O plasma foi diluído 20x. As demais frações apresetam massa diferente, pois foi aplicado um volume constante em todas as frações.

Esse resultado é semelhante ao obtido na purificação com Q Sepharose FF. Vale ressaltar que nesta coluna nós aplicamos 11 mg amostra/mL coluna, enquanto que na coluna Q Sepharose FF foi aplicado menos de 2,2 mg amostra/mL coluna.

A membrana Satobind Q utilizada foi do tipo “single use”. Apesar disso, de acordo com o fabricante, após a sanitização é possível reutilizar a coluna. Nos nossos experimentos, observamos um grande aumento de pressão após a primeira corrida, tendo sido necessário diminuir o fluxo de trabalho de 5 VC/min para 1 VC/min, sem prejuízo do resultado. É importante salientar que o fluxo de 1 VC/min ainda é 2 vezes maior que o empregado nas colunas Sepharose. A regeneração completa somente foi possível quando introduzimos uma etapa de lavagem com uma solução de pepsina 5%.

Os resultados parecem ser promissores, mas não dispomos de uma coluna maior para prosseguir os experimentos com esta coluna.

5.1.6 Purificação da Fração 2/ 4FF em coluna ANX Sepharose FF

Aplicação de 109,6 mg de proteína à coluna

A resina ANX Sepharose FF é uma resina de troca aniônica fraca, enquanto a Q Sepharose FF é uma troca aniônica forte, podendo então, as 2 colunas apresentarem seletividade diferente. Além disso, há uma diferença na porcentagem de “crosslinking”, que é de 4% para a resina ANX e 6% para a Q. Por apresentar uma malha maior, a resina ANX Sepharose FF deve favorecer a ligação de proteínas grandes como a IgM.

Aplicamos a amostra Fração 2, proveniente da purificação em Sepharose 4FF, diretamente na resina ANX Sepharose FF, nas condições experimentais determinadas na purificação em Q Sepharose FF. O cromatograma dessa purificação está ilustrado na Figura 27.

No FT foi observado a presença de 2 picos, que foram recolhidos separadamente e analisados. A análise em gel de poliacrilamida (Figura 28A) e western blot (28B, 28C e 28D) mostraram que as duas frações, FT1 e FT2, não contém IgM e contém IgG e IgA em quantidades semelhantes, por esta razão nos experimentos subsequentes, incluindo os resultados da purificação mostrados a seguir, recolhemos os 2 picos do FT em apenas uma fração.

Figura 27 - Cromatograma da purificação da Fração 2/ 4FF em ANX Sepharose FF - 109,6 mg de proteína.

A Fração 2/ 4FF foi aplicada diretamente na coluna ANX Sepharose FF. A detecção foi feita em UV 280 nm. As frações coletadas foram denominadas FT, Reequilíbrio, 200 mM, 350 mM e 500 mM.

Figura 28 - Gel de poliácridamida 12 % em condições redutoras (A) e análise da presença de IgM (B), IgG (C) e IgA (D) nas frações obtidas na purificação da Fração 2 em ANX Sepharose FF- 109,6 mg de proteína.

Canaletas: M=Padrão de Massa Molecular; F2/ 4FF (54,1µg), FT-1 (8,2 µg), FT-2 (5,4 µg).

(A) Plasma (58,32 µg), F2 (40,5 µg), FT-1 (6,1 µg), FT-2 (4,0 µg).

(B) Plasma (58,32 µg).

(C) Plasma (11,6 µg).

(D) Plasma (58,32 µg).

A dosagem de proteína e o perfil proteico estão mostrados na Tabela 15. As tabelas 16, 17 e 18 mostram os resultados de dosagem de IgM, IgG e IgA por turbidimetria, respectivamente, das frações da purificação em ANX Sepharose FF.

Tabela 15 – Concentração de proteína nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF, em ANX Sepharose FF - 109,6 mg de proteína.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de proteína (mg/ml)	Proteína Total (mg)
Fração 2/ 4 FF	40	2,74	109,6
FT	184	0,27	49,0
Reequilíbrio	339	0,01	2,4
200 mM	241	0,04	8,8
350 mM-A	145	0,10	14,5
350 mM-B	96	0,02	1,9
500 mM	241	0,02	4,8

As análises de western blot (Figura 29B) e turbidimetria (Tabela 16) mostram que a IgM encontra-se majoritariamente na fração 350 mM-A e que a recuperação foi de 68%. A presença de IgG foi observada, por western blot no FT (Figura 29C). Não foi possível dosar esta proteína pelo método turbidimétrico, devido à baixa concentração desta proteína nas frações (Tabela 17). A IgA foi detectada principalmente nas frações FT (28,1%) e eluição com NaCl 350 mM (67,5%), como mostradas na Figura 29D e Tabela 18.

As condições experimentais empregadas para a purificação nas colunas Q Sepharose FF e ANX Sepharose FF foram bastante semelhantes, o que possibilita uma comparação direta dos resultados encontrados. Em relação à recuperação de IgM na fração 350 mM, observamos que foi de 68% na coluna ANX e 55% na coluna Q. Comparando-se as análises de western blot, observamos que na purificação empregando a coluna Q, é possível observar uma banda fraca de IgM na fração 200 mM, enquanto na purificação na ANX encontramos bandas fracas de IgM nas frações 350 mM-B e 500 mM, indicando que esta proteína liga-se mais fortemente na coluna ANX. A recuperação de IgM poderia ser aumentada eluindo-se esta proteína com NaCl 500 mM. Além disso, foi observada, por western blot, a presença de IgM na fração FT da coluna Q, mas não no FT da coluna ANX, indicando que a coluna ANX tem maior capacidade para a purificação de IgM. Nas 2 colunas, a IgG tem menor afinidade à coluna, não se ligando a nenhuma delas, nas condições

experimentais empregadas. O perfil de IgA é semelhante nas 2 colunas testadas, isto é, bandas de IgA, analisadas por western blot, foram observadas em todas as frações coletadas.

Tabela 16 – Dosagem de IgM nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF em ANX Sepharose FF - 109,6 mg de proteína.

Amostras	Volume (ml)	Concentração IgM (mg/mL)	IgM Total (mg)	Recuperação (%)	Proteína total (mg)	Conteúdo específico (mg IgM/ mg proteína)	Fator de purificação
Fração 2/ 4 FF	40	0,31	12,30	100	109,6	0,11	-
FT	184	0,00	-	-	49,0	-	-
Reequilíbrio	339	0,01	-	-	2,4	-	-
200 mM	241	0,00	-	-	8,8	-	-
350 mM-A	145	0,06	8,38	68	14,5	0,57	5
350 mM-B	96	0,02	-	-	1,9	-	-
500 mM	241	0,04	-	-	4,8	-	-

Tabela 17 – Dosagem de IgG nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF, em ANX Sepharose FF - 109,6 mg de proteína.

Amostras	Volume	Concentração final (mg/mL)	IgG Total (mg)
Fração 2/ 4 FF	40	0,21	8,52
FT	184	0,03	-
Reequilíbrio	339	-0,08	-
200 mM	241	-0,05	-
350 mM-A	145	-0,01	-
350 mM-B	96	0,11	-
500 mM	241	0,03	-

Tabela 18 – Dosagem de IgA nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF, em ANX Sepharose FF - 109,6 mg de proteína.

Amostras	Volume	Concentração IgA (mg/mL)	IgA Total (mg)	Recuperação (%)
Fração 2/ 4 FF	40	0,39	16	100
FT	184	0,02	4,4	28,1
Reequilíbrio	339	0,02	-	-
200 mM	241	0,10	-	-
350 mM-A	145	0,04	6,4	40,5
350 mM-B	96	0,04	4,3	27,0
500 mM	241	0,05	-	-

Figura 29 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA das frações obtidas na purificação de IgM em ANX Sepharose FF - 109,6 mg de proteína.

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular, **(A)** **(B)** **(B)** **(D)** Fração 2/ 4FF (32,9 µg), FT (3,2 µg), Reequilíbrio (0,1 µg), 200 mM (0,4 µg), 350 mM-A (1,2 µg), 350 mM-B (0,2µg), 500 mM (0,2µg), Padrão de IgM (2 µg), Padrão IgG (12 µg); **(B)** Padrão de IgM (1 µg); **(C)** Padrão de IgG (12 µg);

As frações apresetam massa diferente, pois foi aplicado um volume constante em todas as frações.

Aplicação de 460 mg de proteína á coluna

Para poder comparar a purificação em ANX Sepharose FF com a purificação em membrana Sartobind Q, realizamos este experimento, aumentando a massa de proteína aplicada de 109,6 mg/mL de resina para 460 mg/mL de resina. O cromatograma dessa purificação está ilustrado na Figura 30.

Figura 30 - Cromatograma da purificação da Fração 2/ 4FF, em ANX Sepharose FF – aplicação de 460 mg.

A Fração 2/ 4FF, foi aplicada diretamente na coluna ANX Sepharose FF. A detecção foi feita em UV 280 nm. As frações coletadas foram denominadas FT, Reequilíbrio, 200 mM, 350 mM e 500 mM.

A dosagem de proteína e o perfil proteico estão mostrados na Tabela 19 e na Figura 31A, respectivamente. As tabelas 20, 21 e 22 mostram os resultados da dosagem de IgM, IgG e IgA, respectivamente, das frações da purificação.

Tabela 19 – Concentração de proteína nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF em ANX Sepharose FF – aplicação de 460 mg.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de proteína (mg/ml)	Proteína Total (mg)
Fração 2/ 4 FF	200	2,30	460,6
FT	344	0,96	330,4
Reequilíbrio	338	0,00	0,2
200 mM	241	0,02	4,7
350 mM-A	145	0,43	62,1
350 mM-B	96	0,08	7,8
500 mM	241	0,06	13,3

A IgM foi recuperada com 70,5% na fração 350 mM-A e 1,8% na fração 350 mM-B (Tabela 20). Pela análise do western blot (Figura 31B) podemos observar que houve uma pequena perda de IgM em 350 mM-B e na lavagem com NaCl 500 mM. Os resultados obtidos por turbidimetria e western blot mostraram que o perfil de purificação de IgM foi igual ao observado no experimento em que se aplicou 5 vezes menos massa. Uma perda de IgM no FT foi observado por western blot, mas não pelo método turbidimétrico, devido ao aumento da massa de amostra aplicada à coluna. No experimento com a membrana Sartobind Q não foi observada perda de IgM no FT, indicando que a membrana pode ter uma capacidade maior para purificar esta proteína.

Em relação a IgG, 80,6% foi recuperada no FT e 9,4% na fração 350 mM-A (Tabela 21). Pela análise do western blot (Figura 31C) podemos observar o mesmo perfil, com uma banda de forte intensidade no FT e uma banda de menor intensidade na fração 350 mM-A. A IgA foi recuperada em todas as frações, 38,9% no FT e 31,4% na fração 350 mM-A (Tabela 22). Nas frações 200 mM e 350 mM-B, a presença foi observada somente por western blot (Figura 31D).

Esses resultados estão de acordo os resultados do experimento anterior e mostram que a IgM pode ser bem separada da grande parte das proteínas presentes na Fração 2, principalmente da albumina, IgG e de uma parte da IgA. Em comparação com a membrana Sartobind Q, os resultados obtidos indicam que a membrana tem capacidade maior para purificar IgM do que a coluna ANX Sepharose FF.

Tabela 20 – Dosagem de IgM nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF em ANX Sepharose FF – aplicação de 460 mg.

Amostras	Volume (ml)	Concentração IgM (mg/mL)	IgM Total (mg)	Recuperação (%)	Proteína total (mg)	Conteúdo específico (mg IgM/ mg proteína)	Fator de purificação
Fração 2/ 4 FF	200	0,24	48,16	100	460,6	0,10	-
FT*	34	0,02	-	-	330,4	0,00	-
Reequilíbrio*	33	-0,02	-	-	0,2	0,00	-
200 mM*	24	-0,02	-	-	4,7	0,00	-
350 mM-A	145	0,23	33,98	70,5	62,1	0,55	5
350 mM-B*	9	0,09	0,85	1,8	7,8	0,11	-
500 mM*	24	0,02	-	-	13,3	0,00	-

*as amostras foram concentradas 10 vezes para realização desse teste.

Tabela 21 – Dosagem de IgG nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF em ANX Sepharose FF – aplicação de 460 mg.

Amostras	Volume (ml)	Concentração IgG (mg/mL)	IgG Total (mg)	Recuperação (%)
Fração 2/ 4 FF	200	0,4	78,2	100
FT*	34	1,8	63,0	80,6
Reequilíbrio*	33	-0,1	-	-
200 mM*	24	-0,1	-	-
350 mM-A*	14	0,5	7,4	9,4
350 mM-B*	9,	-0,1	-	-
500 mM*	24	-0,2	-	-

*as amostras foram concentradas 10 vezes para realização desse teste.

Tabela 22 – Dosagem de IgA nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF em ANX Sepharose FF – aplicação de 460 mg.

Amostras	Volume (ml)	Concentração IgA (mg/mL)	IgA Total (mg)	Recuperação (%)
Fração 2/ 4 FF	200	0,25	50,70	100
FT*	34	0,57	19,74	38,9
Reequilíbrio*	33	-0,07	-	-
200 mM*	24	-0,05	-	-
350 mM-A*	14	1,10	15,90	31,4
350 mM-B*	9	-0,03	-	-
500 mM*	24	-0,06	-	-

*as amostras foram concentradas 10 vezes para realização desse teste.

Figura 31- Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA das frações obtidas na purificação de IgM em ANX Sepharose FF – aplicação de 460 mg.

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular, **(A) (B) (C) (D)** Fração 2/ 4FF (27,6 µg), FT (11,5 µg), Reequilíbrio (0,01 µg), 200 mM (0,2 µg), 350 mM-A (5,1µg), 350 mM-B (1 µg), 500 mM (0,7 µg), Padrão de IgM (2 µg), Padrão IgG (4 µg); **(B)** Padrão de IgM (0,3 µg); **(C)** Padrão IgG (2,4 µg);

O plasma foi diluído 20x. As demais frações apresetam massa diferente, pois foi aplicado um volume constante em todas as frações.

Os resultados de dosagem proteínas por Bradford e das imunoglobulinas por turbidimetria, na fração 350 mM-A, resumidos na Tabela 23, mostram que o conteúdo em massa de IgM foi de 54,7%, de IgG foi de 11,9% e IgA foi de 25,6%, totalizando 92,2% em massa das proteínas totais. Em comparação com o produto comercial Pentaglobin[®], a IgM obtida nesta purificação contém menos IgG e IgA presentes. Entretanto, o conteúdo em massa de imunoglobulina no produto comercial é de 95% enquanto no nosso produto é de 92%, podendo indicar que a pureza da IgM é próxima a do produto comercial. O gel de poliacrilamida em

condições redutoras mostra um perfil de proteínas com muitas bandas, o que reforça que a pureza precisa ser melhorada.

Para verificar a possibilidade de aumentar a pureza de IgM, foi realizado um estudo empregando a coluna de afinidade ao metal de transição cobalto (IMAC- Co^{2+}).

Tabela 23 – Conteúdo proteico da fração 350 mM-A, obtida na purificação em ANX Sepharose FF – aplicação de 460 mg.

	Conteúdo da fração 350 mM-A (mg)	Imunoglobulinas na fração 350 mM-A (%)	Conteúdo do Pentaglobin® (mg)*	Imunoglobulinas Pentaglobin® (%)*
Proteína Total	62,10	-	50	-
IgM	33,98	54,7	6	12
IgG	7,40	11,9	38	76
IgA	15,90	25,6	6	12
Total de imunoglobulinas	57,28	92,2	50	> 95

*Valor especificado pelo fabricante

5.1.7 Purificação de IgM empregando cromatografia de afinidade a metal (IMAC- Co^{2+})

Na purificação em coluna de troca aniônica, a proporção de IgM em relação à IgG e IgA é melhor que a da Pentaglobin. Entretanto, a porcentagem de imunoglobulinas é menor que a do produto comercial. Para remover as proteínas contaminantes do eluato da ANX Sepharose FF, realizamos experimentos em coluna de afinidade a metal. Escolhemos como metal ligante o Co^{2+} , pois esta coluna foi utilizada com sucesso para purificação de IgM monoclonal (MARTINS et al., 2006a, 2006b).

A técnica foi escolhida, porque as imunoglobulinas apresentam regiões ricas em histidinas na cadeia pesada, o que favoreceria a ligação de IgM à coluna (MARTINS et al., 2011).

As purificações em IMAC- Co^{2+} foram realizadas aplicando-se à coluna o eluato da coluna de troca aniônica, nos pHs 6,0, 7,1 e 8,0, e a Fração 2 da coluna Sepharose 4FF.

Purificação do eluato da ANX Sepharose FF em pH 7,1

Iniciou-se a purificação em IMAC- Co^{2+} em pH 7,1 porque é o pH do eluato da coluna ANX Sepharose FF e este poderia ser diretamente aplicado à coluna de afinidade a metal. Foi realizado um gradiente linear de imidazol de 0 a 500 mM para a eluição das proteínas adsorvidas à coluna e recolhidas frações de 5 mL.

O cromatograma desta purificação pode ser observado na Figura 32A e a ampliação da área do gradiente linear na Figura 32B. Podemos observar que as proteínas presentes estão fracamente ligadas à coluna, pois todas eluíram com 30% do tampão contendo imidazol 500 mM, o que corresponde a imidazol 150 mM. Também observamos a presença de 2 picos. A fração 1 contém principalmente as proteínas do primeiro pico e a fração 2 as proteínas do segundo pico.

Figura 32 - Cromatograma da purificação do eluato da coluna ANX Sepharose FF, em IMAC- Co^{2+} , em pH 7,1.

(A) Cromatograma da purificação do eluato da coluna ANX Sepharose FF, em IMAC- Co^{2+} ;
(B) Ampliação da área do gradiente linear. A detecção foi feita em UV 280 nm.

A tabela 24 mostra os resultados da determinação da concentração de proteínas das frações, determinadas pelo método de Bradford. Pode-se observar que a maioria das proteínas são adsorvidas à coluna.

Tabela 24 - Concentração de proteínas nas frações da purificação do eluato da coluna ANX Sepharose FF, em coluna de IMAC-Co²⁺, em pH 7,1.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
350 mM - A	115	0,11	12,7
FT	140	0,02	2,2
Reeq	48	0,00	0,0
Fração 1	5	0,45	2,3
Fração 2	5	0,66	3,3
Fração 3	5	0,18	0,9
Fração 4	5	0,03	0,2
Fração 5-18	65	0,01	0,4

A análise por western blot mostra que a IgM e a IgA estão presentes no FT e principalmente na fração 1, isto é, as 2 imunoglobulinas tem o mesmo perfil de adsorção também na coluna de IMAC (Figura 33B e 33D). A presença destas imunoglobulinas em todas as frações coletadas pode ser explicada pela larga faixa de pI das imunoglobulinas.

Grande parte da IgG foi separada da IgM na coluna de troca aniônica, mas a análise de western blot, apresentado na figura 33C, mostra que a IgG está presente na amostra de entrada. A análise por western blot mostra que esta imunoglobulina está presente quase exclusivamente na fração 1. Esta imunoglobulina tem maior afinidade pela coluna de IMAC e encontra-se concentrada na fração 1. Como já foi observado anteriormente, o anticorpo contra IgG utilizado não é monoclonal, que reconhece as cadeias pesada e leve de IgG, mas também as cadeias leves das IgM e IgA.

A análise de SDS-PAGE mostra que além das imunoglobulinas, as proteínas contaminantes presentes na amostra também se ligaram à coluna (Figura 33A). Este resultado não está de acordo com o observado por Martins et al., (2006a, 2006b), para a purificação de IgM monoclonal em IMAC-Co²⁺. Nestes experimentos, a IgM ligou-se à coluna, enquanto as proteínas contaminantes não, ou seja, a IgM ligou-se mais fortemente à coluna que as proteínas contaminantes. No nosso experimento, as proteínas estão mais concentradas na fração 2, portanto, ligaram-se mais fortemente à coluna que a IgM.

Embora a coluna IMAC- Co^{2+} tenha sido empregada com sucesso para purificar IgM monoclonal, a purificação de IgM a partir do plasma não foi eficiente, devido à diferença de perfil das proteínas contaminantes presentes nas 2 purificações.

Figura 33 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA das frações obtidas na purificação do eluato da coluna ANX Sepharose FF em IMAC- Co^{2+} , em pH 7,1.

Canaletas: **(A) (B) (C) (D)** MM = Padrão de Massa Molecular, Fração 2 4FF (44 μg), 350 mM-A ANX FF (1,32 μg), FT (0,19 μg), Gradiente 1 (5,42 μg), Gradiente 2 (7,91 μg), Gradiente 3 (2,19 μg), Gradiente 4 (0,42 μg), Gradiente 5-18 (0,07 μg). A amostra FT foi concentrada 10 vezes. As frações apresetam massa diferente, pois foi aplicado um volume constante em todas as frações.

Para modificar a afinidade das proteínas pela coluna e melhorar a separação das imunoglobulinas com as proteínas contaminantes, foram realizados experimentos variando o pH das purificações. O aumento de pH aumenta a

afinidade das proteínas que contém histidina na sua superfície, enquanto a diminuição do pH, diminui a afinidade destas proteínas pela coluna. Aumentando-se o pH para 8,0 a IgM poderia ser totalmente adsorvida à coluna e a separação das proteínas contaminantes poderia ser conseguida com gradiente de imidazol.

Purificação do eluato da Q Sepharose FF em pH 8,0

Neste teste aplicamos o eluato da coluna Q Sepharose FF, uma vez que o perfil de proteínas observado em gel de SDS-PAGE indica que as frações 350 mM-A eluidas das colunas Q Sepharose FF e ANX Sepharose FF são semelhantes. Como a primeira coluna foi realizada em pH 7,0, foi necessário ajustar o pH do eluato para 8,0 para esta purificação. A eluição das amostras adsorvidas na coluna foi realizada com um gradiente linear de 0 a 500 mM de imidazol.

O cromatograma desta purificação pode ser observado na Figura 34A e a ampliação da área do gradiente linear na Figura 34B. A Tabela 25 e a Figura 35 mostram a dosagem de proteína, bem como a análise por SDS-PAGE e werten blot das frações coletadas.

Figura 34 - Cromatograma da purificação do eluato da coluna Q Sepharose FF, em IMAC- Co^{2+} , em pH 8,0.

(A) Cromatograma da purificação do eluato da coluna Q Sepharose FF, em IMAC- Co^{2+} ; **(B)** Ampliação da área do gradiente linear. A detecção foi feita em UV 280 nm.

Observamos que o perfil cromatográfico das purificações em pH 7,1 e pH 8,0 é diferente. Enquanto em pH 7,1 observamos 2 picos que não estão completamente separados, em pH 8,0 observamos apenas 1 pico. As frações 1 e 2 destas

purificações contém grande parte das proteínas que estão adsorvidas (Tabel 25). A fração 1 das purificações em pH 7,1 e pH 8,0 contém a maior concentração das 3 imunoglobulinas testadas. A diferença entre as 2 purificações está no perfil das proteínas da fração 2. Enquanto o perfil da fração 2 da purificação em pH 7,0 contém bandas de proteínas contaminantes que não estão presente na fração 1, na purificação em pH 8,0, o perfil da fração 2 é igual ao da fração 1, indicando que há uma diferença na afinidade de algumas proteínas contaminantes na purificação em pH 7,0, que não é observada quando a purificação foi realizada em pH 8,0, embora todas as proteínas adsorvidas tenha sido eluídas com concentração de imidazol ≤ 150 mM nas 2 purificações. Em relação ao perfil cromatográfico das imunoglobulinas, o experimento em pH 8,0 apresentou o mesmo perfil do experimento realizado em pH 7,0, a IgM continuou sendo coletada no FT (Figura 35B) e nas frações das proteínas adsorvidas, principalmente na fração 1 e a IgG foi encontrada somente na fração 1 (Figura 35C). Portanto, o aumento de pH não levou a uma melhora na purificação de IgM.

Tabela 25 - Concentração de proteínas nas frações da purificação do eluato da coluna Q Sepharose FF, em coluna de IMAC- Co^{2+} , em pH 8,0.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
350 mM - A	125	0,09	11,1
FT	151	0,01	1,0
Reeq	50	-0,01	-
Fração 1	5	0,93	4,7
Fração 2	5	0,31	1,5
Fração 3	5	0,03	0,2
Fração 4	5	0,01	0,0
Fração 5-18	70	0,01	0,4

Figura 35 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM e IgG das frações obtidas na purificação do eluato da coluna Q Sepharose FF em IMAC- Co^{2+} , em pH 8,0.

Canaletas: **(A) (B) (C)** MM = Padrão de Massa Molecular, Fração 2 4FF (44 μg), 350 mM-A Q FF (1,06 μg), FT (0,08 μg), Gradiente 1 (11,17 μg), Gradiente 2 (3,70 μg), Gradiente 3 (0,07 μg), Gradiente 4 (0,07 μg), Gradiente 5-18 (0,09 μg). A amostra FT foi concentrada 10 vezes. As frações apresetam massa diferente, pois foi aplicado um volume constante em todas as frações.

Purificação do eluato da ANX Sepharose FF em pH 6,0

Neste experimento foi utilizada a amostra 350 mM-A, proveniente da purificação em ANX Sepharose FF. A eluição das proteínas adsorvidas foi realizada com um gradiente linear de imidazol de 0 a 200 mM, uma vez que já sabíamos que as proteínas poderiam ser eluídas da coluna com até imidazol 200 mM. O pH da amostra foi ajustado para pH 6,0.

O cromatograma desta purificação pode ser observado na Figura 36A e a ampliação da área do gradiente linear na Figura 36B. Em pH 6,0, observamos a presença de somente um pico.

Figura 36 - Cromatograma da purificação do eluato da coluna ANX Sepharose FF, em IMAC- Co^{2+} , em pH 6,0.

(A) Cromatograma da purificação do eluato da coluna ANX Sepharose FF, em IMAC- Co^{2+} ; **(B)** Ampliação da área do gradiente linear. A detecção foi feita em UV 280 nm.

A tabela 26 mostra a concentração de proteínas nas frações da purificação. Como era esperado, observou-se uma diminuição de proteínas adsorvidas na coluna com a diminuição de pH de 7,0 para 6,0. Em pH 6,0, cerca de 46 % foram recolhidas no FT e 37% das proteínas foram adsorvidas à coluna. Em pH 7,0, em torno de 17% foram recolhidas no FT e 56% das proteínas foram adsorvidas à coluna. Também pode ser observado por western blot, que a diminuição de pH também aumentou a quantidade de IgM presente no FT (Figura 37B), embora continue sendo observada nas frações das proteínas adsorvidas na coluna. A diminuição de pH levou a IgG a sair majoritariamente no FT (Figura 37C).

Tabela 26 - Concentração de proteínas nas frações da purificação do eluato da coluna ANXSepharose FF, em coluna de IMAC- Co^{2+} , em pH 6,0.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
350 mM - A	120	0,13	16,2
FT	179	0,04	7,5
Reeq	14	0,00	0,0
Fração 1	5	0,04	0,2
Fração 2	5	0,04	0,2
Fração 3	5	0,07	0,3
Fração 4	5	0,09	0,4
Fração 5	5	0,11	0,6
Fração 6	5	0,12	0,6
Fração 7	5	0,11	0,5
Fração 8	5	0,11	0,5
Fração 9	5	0,13	0,7
Fração 10	5	0,09	0,4
Fração 11	5	0,08	0,4
Fração 12	5	0,07	0,3
Fração 13	5	0,06	0,3
Fração 14	5	0,04	0,2
Fração 15	5	0,02	0,1
Fração 16	5	0,02	0,1
Fração 17	5	0,02	0,1
Fração 18	5	0,01	0,0
Fração 19	2	0,00	0,0

Figura 37 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM e IgG das frações obtidas na purificação do eluato da coluna Q Sepharose FF em IMAC- Co^{2+} , em pH 6,0.

Canaletas: **(A) (B) (C)** MM = Padrão de Massa Molecular, Plasma (43,74 µg), Fração 2 4FF (44 µg), 350 mM-A ANX FF (1,62 µg), FT (0,51 µg), Reequilíbrio (0,01 µg), Gradiente 1 (0,43 µg), Gradiente 2 (0,53 µg), Gradiente 3 (0,81 µg), Gradiente 4 (1,03 µg), Gradiente 5 (1,36 µg), Gradiente 6 (1,42 µg), Gradiente 7 (1,31 µg), Gradiente 8 (1,28 µg), Gradiente 9 (1,61 µg), Gradiente 10 (1,07 µg), Gradiente 11 (1 µg), Gradiente 12 (0,81 µg), Gradiente 13-19 (0,28 µg). A amostra FT foi concentrada 10 vezes. As frações apresetam massa diferente, pois foi aplicado um volume constante em todas as frações.

Purificação da Fração 2/ 4 FF

Finalmente, realizamos a purificação da Fração 2 da purificação em Sepharose 4 FF diretamente na coluna IMAC- Co^{2+} , isto é, não houve uma separação da IgG da amostra de IgM.

Foi realizado um gradiente linear de imidazol de 0 a 500 mM para a eluição das proteínas adsorvidas à coluna. O cromatograma desta purificação pode ser observado na Figura 38A e a ampliação da área do gradiente linear na Figura 38B. Também observamos 2 picos no cromatograma, como na purificação do eluato da ANX Sepharose FF em pH 7,0. A Tabela 27 mostra a concentração de proteínas nas frações da purificação.

Figura 38 - Cromatograma da purificação da Fração 2/ 4 FF em IMAC- Co^{2+} , em pH 7,1.

(A) Cromatograma da purificação da Fração 2/ 4FF em IMAC- Co^{2+} ; **(B)** Ampliação da área do gradiente linear. A detecção foi feita em UV 280 nm.

Tabela 27 - Concentração de proteínas nas frações da purificação da Fração 2/ 4FF em IMAC- Co^{2+} , em pH 7,1.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
F2 4FF	12	1,70	21,3
FT	37	0,14	5,2
Reequilíbrio	47	0,02	0,8
Fração 1	5	0,88	4,4
Fração 2	5	1,23	6,1
Fração 3	5	0,46	2,3
Fração 4	5	0,10	0,5
Fração 5	5	0,03	0,1
Fração 6-18	65	0,01	0,6

A análise de western blot sugere que a imunoglobulinas IgM e IgG estão mais concentradas na fração 1 (Figuras 39B e 39C). Portanto, em IMAC, nas condições experimentais empregadas, não foi possível separar a IgM da IgG, nem separar IgM de outras proteínas contaminantes.

Com base nesses resultados podemos concluir que a técnica utilizada com IMAC- Co^{2+} não foi eficiente para purificação de IgM a partir da Fração 2 da coluna Sepharose 4FF.

Figura 39 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM e IgG das frações obtidas na purificação da Fração 2/ 4FF em IMAC- Co^{2+} , em pH 7,1.

Canaletas: **(A) (B) (C)** MM = Padrão de Massa Molecular, Fração 2/ 4FF (20,4 μg), FT (1,7 μg), Reequilíbrio (0,2 μg), Gradiente 1 (10,5 μg), Gradiente 2 (14,7 μg), Gradiente 3 (5,5 μg), Gradiente 4 (1,2 μg), Gradiente 5 (0,3 μg), Gradiente 6-18 (0,1 μg). As frações apresetam massa diferente, pois foi aplicado um volume constante em todas as frações.

5.1.8 Discussão Geral da Estratégia 1 da purificação de IgM

Desde a década de 70 podem ser encontrados relatos na literatura sobre a purificação de IgM, como o trabalho descrito por Pattison e Mace em 1975. Em geral, a purificação de IgM a partir de soro ou plasma era descrita para se obter uma IgM pura para uso analítico. A única descrição em escala de piloto de nosso conhecimento foi feita por Tornøe et al., 1997, para a purificação de IgM monoclonal.

Em alguns casos, a presença de IgM é citada nos processos de produção descritos para IgG (TANAKA, 2000; VARGAS et al., 2012; VARGAS et al., 2015; WU et al., 2014).

Em 1981, Jehanli e Hough descreveram a utilização da coluna de gel filtração Ultrogel AcA 34 seguida da coluna de troca aniônica DEAE Sepharose CL6B para purificação de IgM a partir de plasma desfibrinado. Utilizando essas duas colunas, obtiveram um rendimento de IgM maior que 70%. A separação de IgM de outras proteínas por gel filtração é bem sugestiva, pois a IgM apresenta cerca de 970 kDa, enquanto que a IgG e albumina por exemplo, que são as duas proteínas mais abundantes no plasma, apresentam aproximadamente 150 e 66 kDa, respectivamente. No entanto, em geral, nas colunas de gel filtração o volume de amostra aplicado é cerca de 2 a 5% do volume da coluna, dificultando o escalonamento do método, prevalecendo o uso em caráter analítico.

Neste trabalho nós propomos utilizar as mesmas técnicas utilizadas por Jehanli e Hough, uma gel filtração seguida de uma troca aniônica. Entretanto, a coluna de gel filtração utilizada neste trabalho, a Sepharose 4 FF, é para uso industrial e podemos aplicar de 20 a 25% volumes de coluna de amostra. Esta proposta baseia-se no aproveitamento de uma fração descartada no processo industrial de purificação de Hemoderivados do Instituto Butantan, que estava sendo implantado no início deste trabalho.

Os resultados obtidos com a purificação de plasma na coluna de gel filtração Sepharose 4 FF mostram que é possível separar cerca de 63% de IgM das proteínas mais abundantes, como albumina e IgG, além de separar também uma grande parte de IgA. No entanto, apenas essa purificação não é suficiente para se obter IgM com pureza necessária para uso intravenoso. A composição de imunoglobulinas em nossa purificação é de 35% em relação ao total de proteínas presentes e o produto comercial Pentaglobin[®] contem 95% de imunoglobulinas em relação à massa total de proteínas presentes na sua composição.

Na planta piloto de Hemoderivados do Instituto Butantan foram testadas 2 estratégias de purificação de IgG. Três lotes foram produzidos sem a etapa de purificação na coluna Sepharose 4FF, porque não havia interesse na produção dos fatores de coagulação FVIII e FIX. Em 2 lotes, o processo de fracionamento do plasma iniciou-se com a purificação de plasma na coluna Sepharose 4FF com a coleta das 4 frações. Podemos observar na Figura 40B que nos três primeiros

processos a IgM foi detectada no concentrado final de IgG e que nos 2 lotes em que a coluna Sepharose 4 FF foi utilizada não foi observada a banda de IgM. Estes resultados mostram que quando a IgM não foi separada da IgG na primeira coluna do processo, a IgM acompanhou a IgG até o final do processo, não foi possível eliminar a IgM dos concentrados de IgG. Portanto a separação da Fração 2 da Separose 4FF pode ter dupla finalidade: obtenção de IgM e obtenção de IgG sem a contaminação por IgM.

Figura 40 - Gel de poliacrilamida 12% e western blot para detecção de IgM nos lotes de IgG produzidos na planta piloto de Hemoderivados do Instituto Butantan.

Canaletas: **(A)** Gel de poliacrilamida 12 % e **(B)** Western blot para detecção de IgM: MM = Padrão de Massa Molecular, 1. Lote 1, 2. Lote 2, 3. Lote 4, 4. Lote 5, 5. Lote 6. Foi aplicado 0,8 μ L de cada amostra.

Propomos uma segunda etapa de purificação em coluna de troca aniônica, que separam as proteínas por carga.

Neste trabalho, testamos as colunas ANX Sepharose FF, Q Sepharose FF, coluna monolítica QA e membrana Sartobind Q nano. A coluna ANX Sepharose FF foi escolhida para ser testada porque tem 4% de “crosslinking”, o que favorece a entrada de moléculas grandes no interior dos “beads” em comparação com a coluna Q Sepharose FF que possui “crosslinking” de 6%.

As colunas monolítica e de membrana são colunas que tem uma estrutura que favorecem a purificação de moléculas de alta massa molecular, pois o transporte de massa no interior da coluna é somente por convecção e não por difusão. Se, de um lado, possuem menor área e, portanto, menor número de grupos

ligantes e por isso menor capacidade de ligação, tem, por outro lado, menor pressão de trabalho (back pressure) possibilitando aumentar o fluxo para vários volumes de coluna (VC) por minuto. Os fluxos empregados nas purificações foram os recomendados pelos fabricantes. Com as colunas Sepharose, que estão na forma de beads, os fluxos utilizados foram próximos de 0,5 VC/min, enquanto que com o monolito e a membrana, foram utilizados fluxos iniciais de 2,5 VC/min e 5 VC/min.

Os resultados obtidos por western blot indicam que foi possível obter uma boa separação entre a IgM e a maioria das proteínas, inclusive a IgG, em todas as colunas. A coluna monolítica QA e a membrana Sartobind Q não foram empregadas em estudos posteriores porque eram colunas analíticas e não preparativas.

Entre as colunas de bead, a coluna ANX Sepharose FF apresentou resultados melhores que a coluna Q Sepharose FF, porque, apesar do perfil e do fator de purificação serem muito semelhantes, a recuperação de IgM na fração eluída com NaCl 350 mM foi maior utilizando a coluna ANX Sepharose FF (Tabela 28) e sem perdas no FT. Isso provavelmente se deve ao “crosslinking” de 4% da resina ANX Sepharose FF, que favorece a ligação de proteínas grandes.

Tabela 28 – Comparação da recuperação e fator de purificação de IgM utilizando as colunas de troca aniônica Q Sepharose FF e ANX Sepharose FF.

Coluna	VC (ml)	Quantidade de proteína total aplicada (mg)	Recuperação IgM (%)	Fator de Purificação IgM
Q Sepharose FF	45,7	101	55	6
ANX Sepharose FF	48,3	109	68	5

Em relação à purificação em IMAC-Co²⁺ esperávamos que as imunoglobulinas fossem adsorvidas à coluna devido à presença de histidinas em sua estrutura. No entanto, observamos que em pH 7,0, parte da IgM não se liga à coluna e parte se liga, enquanto a maioria das proteínas contaminantes são adsorvidas à coluna. Então variamos o pH para obter a IgM ou somente no FT (pH 6,0) ou somente com as proteínas adsorvidas (pH8,0), mas nos 3 pHs testados a IgM foi recuperada em todas as frações coletadas. As imunoglobulinas apresentam uma faixa muito extensa de pI, o que pode ter contribuído para que o perfil desejado não fosse alcançado. Provavelmente, o sucesso na purificação de IgM monoclonal por Martins et al., (2006a, 2006b), se deve não somente à diferença de perfil das

proteínas contaminantes presentes nas 2 purificações, mas também ao fato da IgM monoclonal apresentar uma faixa mais estreita de pI (MUELLER et al., 2013) em comparação com a IgM do plasma (GAUTAM; LOH, 2011). Concluímos que essa técnica não foi eficiente na purificação de IgM.

Apresentamos na Tabela 29 o resumo dos resultados de purificação de IgM empregando a estratégia 1. Na purificação de plasma em Sepharose 4 FF a recuperação de IgM foi de 63%, com fator de purificação de 6,5 vezes. Na purificação da Fração 2 da 4 FF na coluna ANX Sepharose FF, a recuperação de IgM foi de 70%, com fator de purificação de 5 vezes. No geral, o fator de purificação foi de 35 vezes em relação ao plasma.

Tabela 29 – Recuperação e Fator de purificação de IgM na Estratégia 1.

	Volume (ml)	Recuperação de IgM (%)	IgM Total (mg)	Proteína Total (mg)	Conteúdo específico (mg IgM/ mg proteína)	Fator de Purificação da etapa	Fator de purificação geral
Plasma	300	100	252,75	16438	0,02	-	-
Fração 2/ 4 FF	600	63,7	161, 10	1237	0,13	6,5	-
Fração 2/ 4 FF	200	100	43,47	460,6	0,09	-	-
350 mM-A/ ANX Sepharose FF	145	70,5	29,76	62,1	0,48	5,3	34,5

É importante notar que observamos uma variação na pureza de IgM quando variamos a quantidade de amostra de entrada na coluna ANX Sepharose FF, embora a recuperação de IgM tenha sido de em torno de 70% nas 2 purificações (Tabelas 16 e 20). No experimento em que aplicamos a quantidade menor de amostra, a porcentagem final de imunoglobulinas após a coluna de troca aniônica foi de 99% e no experimento que aplicamos mais amostra a porcentagem de imunoglobulina foi de 92,2%. Um valor está acima do valor do produto comercial Pentaglobin, que apresenta porcentagem de imunoglobulinas de 95%, e um está abaixo deste valor. Isto indica que ainda não encontramos a quantidade de amostra de entrada para se obter o maior rendimento na pureza desejada. Além disso, a análise do gel de poliacrilamida indica que ainda existem muitas bandas de proteínas, o que reforça a necessidade de um produto mais puro. Mesmo assim

podemos afirmar que em relação à composição de imunoglobulinas, o nosso produto encontra-se mais enriquecido de IgM do que o produto comercial. A pureza ainda precisa ser melhorada, mas para isso provavelmente teríamos que utilizar um método mais drástico como a precipitação, devido ao fato da IgM apresentar massa molecular grande e precipitar com maior facilidade que outras proteínas ou uma coluna de afinidade específica para capturar a IgM, o que tornaria o processo mais caro.

5.2 Estratégia 2

A estratégia 2 é uma estratégia que vem sendo desenvolvida no laboratório com o objetivo de fracionar o plasma empregando somente cromatografia líquida. A primeira etapa de purificação consistiu em separar o fator VIII de coagulação e as proteínas dependentes de vitamina K das demais proteínas do plasma, sem que fosse necessária a separação do crioprecipitado. Nesta coluna, a ANX Sepharose FF, os fatores de coagulação são adsorvidas à coluna, enquanto mais de 99% das proteínas presentes no plasma encontram-se no FT. Portanto, o FT da primeira coluna foi utilizado como amostra inicial para a purificação de IgM.

O protocolo de partida para a purificação de IgM foi elaborado com base na separação de albumina e IgG em coluna de troca aniônica. Em 1982, Fourcart et al., purificaram a albumina e a IgG a partir de criopobre de plasma humano em pH 8,8, utilizando a coluna de troca aniônica DEAE-Trisacryl M. Nas condições empregadas, a IgG foi recuperada no FT, enquanto a albumina foi adsorvida à coluna e eluída com tampão Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5. Em 2012, Qin, Chen e Li purificaram IgG e albumina a partir de soro de coelho em coluna Q Sepharose XL. O soro aplicado à coluna foi diluído 10 vezes e aplicado à coluna. As proteínas foram eluídas empregando gradiente de pH. A IgG foi eluída com pH 6,0 e albumina com pH 4,0 e ambas as proteínas foram recuperadas com mais 90% de pureza. Yang e Harrison (1996) mostraram que a imunoglobulina G de espécies diferentes pode apresentar diferentes perfis de adsorção em uma mesma coluna de troca aniônica ou catiônica nas mesmas condições experimentais. A partir destas informações elaboramos um protocolo inicial para purificar IgM a partir de plasma. A resina escolhida foi a Q Sepharose FF. Os experimentos em Q Sepharose FF foram numerados em sequência e detalhes do gradiente usado está descrito em seguida.

5.2.1 Purificação de plasma em ANX Sepharose FF - obtenção da amostra de entrada

Para a obtenção do FT, que foi utilizado para estudar a purificação de IgM, foi realizado a purificação de plasma em coluna de ANX Sepharose FF. O plasma, com o pH previamente ajustado para 6,0, foi aplicado à coluna, o FT foi recolhido e a coluna lavada com tampão citrato contendo NaCl 500 mM.

O cromatograma da purificação (Figura 41) juntamente com a Tabela 30 mostram que praticamente toda proteína que é aplicada à coluna encontra-se no FT. A partir de 483 mL de plasma, foram recolhidos em 845 mL. Portanto as proteínas presentes no FT foram diluídas 1,7 vezes em relação ao plasma. Esta diluição foi levada em consideração para a diluição da amostra aplicada à coluna Q Sepharose FF. A Tabela 31 mostra os resultados da análise quantitativa das imunoglobulinas no FT. Toda IgG e IgA foram recuperadas no FT, enquanto que 68,5% da IgM foi recuperada nessa fração, confirmando a presença das imunoglobulinas nesta fração.

Figura 41 – Cromatograma da purificação de plasma na coluna ANX Sepharose FF.

O plasma foi aplicado à coluna ANX Sepharose FF em pH 6,0. A detecção foi feita em UV 280 nm. As frações coletadas foram denominadas FT, Reequilíbrio, e 500 mM.

Tabela 30 – Concentração de proteína no FT da purificação de plasma em ANX Sepharose FF.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
Plasma	483	60,4	29190
FT	845	35,4	29911

Tabela 31 – Recuperação de IgM, IgG e IgA na purificação de plasma em ANX Sepharose FF.

	IgM (mg)	Recuperação IgM (%)	IgG (mg)	Recuperação IgG (%)	IgA (mg)	Recuperação IgA (%)
Plasma	348,8	100	3531,2	100	1032,1	100
FT	238,8	69	3619,5	102,5	1006,9	98

5.2.2 Experimento 1 - pH 8,0, 6,0, 4,5 e 4,0

O protocolo inicial consistiu em diluir o FT da ANX Sepharose FF proveniente da purificação em ANX Sepharose FF 17 vezes em relação ao plasma, utilizando tampão de equilíbrio Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Realizamos o gradiente de pH 6,0, 4,5 e 4,0. Aplicamos 1,7 g de proteína à coluna, que corresponde a 0,6 VC de plasma, considerando a concentração de proteínas do plasma é 60 mg/mL (Tabela 32) e que a coluna Q Sepharose que usamos tem 46 mL.

Na Figura 42 observamos o cromatograma dessa purificação. As frações da purificação foram denominadas Entrada, Entrada diluída 17 x, FT, Reequilíbrio, pH 6,0-a, pH 6,0-b, pH 4,5-a, pH 4,5-b, pH 4,0 e pH 4,0 NaCl 500 mM. A amostra denominada Entrada se refere ao FT da purificação de plasma em ANX Sepharose FF.

A albumina, como era esperada, foi eluída com pH 4,5 e pode ser observada através da banda intensa de aproximadamente 66 kDa (Figura 44A). É a mais abundante do plasma e corresponde à metade das proteínas, o que pode ser confirmado pela dosagem de proteínas pelo método de Bradford (Figura 43).

Bandas correspondentes à cadeia pesada IgG (aproximadamente 50 kDa) e à cadeia leve (25 kDa) podem ser observadas nas frações FT e pH 6,0-a e 6,0-b (Figura 44C). A IgG liga-se mais fracamente à coluna do que a albumina e por isso pode ser eluída em pH mais alto. As imunoglobulinas IgM e IgA foram detectadas por western blot em todas as frações coletadas (Figuras 44B e 44D).

Não ficou claro para nós se a presença de IgG no FT foi devido a sua larga faixa de pl ou se a quantidade de amostra aplicada excedeu a capacidade da coluna. Desta forma, a quantidade de amostra aplicada á coluna do experimento seguinte foi diminuído para 200 mg de proteína.

Este experimento demonstrou que a albumina e a IgG podem ser muito bem separadas em gradiente de pH. Entretanto, para a recuperação de IgM e IgA os resultados não foram satisfatórios.

Figura 42 – Cromatograma do Experimento 1.

O FT proveniente da purificação em ANX Sepharose FF foi diluído 17 vezes e aplicado na coluna Q Sepharose FF em pH 8,0. A detecção foi feita em UV 280 nm. Foi realizado um gradiente de pH em step com pH 6,0, 4,5 e 4,0. Algumas frações foram separadas em a e b para recolher o pico de proteína menos diluído.

Tabela 32 – Concentração de proteína nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 1.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
Entrada	45,7	36,84	1682
Entrada diluída 17x	456,6	3,64	1663
FT	528,8	0,18	95,8
Reequilíbrio	318,9	0,01	3,0
pH 6,0 -a	134,2	0,07	9,2
pH 6,0 -b	169,1	0,38	63,9
pH 4,5 -a	136,1	8,02	1091
pH 4,5 -b	91,4	0,15	13,8
pH 4,0	229,4	0,36	81,5
pH 4,0 com NaCl 1M -a	79,7	0,50	40,2
pH 4,0 com NaCl 1M - b	124,4	0,01	0,9

Figura 43 – Proteína total nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 1.

Figura 44 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA nas frações obtidas na purificação em Q Sepharose FF – Experimento 1.

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular, E1 = Entrada, E2 = Entrada diluída 17 vezes, **(A) (B) (D)** Entrada (22,1 µg), Entrada diluída (4,4 µg), FT (2,2 µg), Reequilíbrio (0,1 µg), pH 6a (0,8 µg), pH 6b (4,5 µg), pH 4,5a (9,6 µg), 4 (4,3 µg), pH 4 NaCl (6,1 µg); E1 diluído 10 x, E2 diluído 20 x e demais amostras sem diluição. **(C)** Entrada (22,1 µg), Entrada diluída (43,7 µg), FT (0,1 µg), Reequilíbrio (0,1 µg), pH 6a (0,8 µg), pH 6b (0,2 µg), pH 4,5a (96,2 µg), pH 4 (4,3 µg), pH 4 NaCl (6,1 µg). E1, E2 e pH 6,0b diluídos 20 x, demais amostras sem diluição.

5.2.3 Experimento 2 – pH 8,0, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5 e 4,0

Com o objetivo de verificar com maior precisão o perfil de eluição das imunoglobulinas em função do pH, realizamos um gradiente de pH com 7 degraus a partir de pH 8,0, depois pH 7,0 e em seguida decrescendo de meia em meia unidade

até pH 4,0. Para garantir um tamponamento melhor, aumentamos a concentração dos tampões de 20 mM para 100 mM.

O cromatograma desta purificação pode ser observado na Figura 45 e a dosagem de proteínas na Tabela 33.

Figura 45 – Cromatograma do Experimento 2.

O FT proveniente da purificação em ANX Sepharose FF foi diluído 10 vezes e aplicado na coluna Q Sepharose FF em pH 8,0. A detecção foi feita em UV 280 nm. Foi realizado um gradiente de pH em step com pH 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5 e 4,0.

Os resultados obtidos indicam que o aumento de condutividade decorrente do aumento da concentração dos tampões de 20 mM para 100 mM levou a albumina e a IgG a interagirem mais fracamente com a resina. A IgG deixou de ser adsorvida à coluna e foi recolhida somente no FT e a albumina foi eluída em pH 5,5 e em menor quantidade em pH 5,0. A IgM e a IgA eluíram principalmente com pH 5,0 (Figuras 46B e 46D).

Conseguimos analisar melhor o perfil das proteínas aplicando cerca de 200 mg de proteína à coluna. Houve uma separação satisfatória da IgG, albumina e IgM, mas não foi possível separar a IgM e a IgA (Figura 46).

Como o FT da ANX Sepharose FF está em pH 6,0 e a albumina eluiu somente em pH 5,5, verificamos o perfil de separação das proteínas na coluna Q Sepharose FF quando iniciamos o gradiente pH em pH 6,0 ao invés de 8,0.

Tabela 33 – Concentração de proteína nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 2.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
Entrada	5,65	44,48	251,3
Entrada diluída	33,33	6,66	221,9
FT	170,97	0,09	14,7
Reequilíbrio	319,32	0,01	2,2
pH 7,0	228,3	0,04	9,5
pH 6,5	228,3	0,00	1,0
pH 6,0	228,3	0,02	3,5
pH 5,5	228,3	0,31	71,5
pH 5,0	228,3	0,09	19,7
pH 4,5	228,3	0,02	5,5
pH 4,0	228,3	0,02	3,4
pH 4,0 com NaCl	228,3	0,01	2,9

Figura 46 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA nas frações obtidas na purificação em Q Sepharose FF – Experimento 2.

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular, E1 = Entrada, E2 = Entrada diluída 17 vezes, **(A) (B) (C) (D)** Plasma (32,8 µg), Entrada (26,7 µg), Entrada diluída (4,0 µg), FT (1,0 µg), Reequilíbrio (0,1 µg), pH 7,0 (0,5 µg), pH 6,5 (0,1 µg), pH 6,0 (0,2 µg), pH 5,5 (3,8 µg), pH 5,0 (1,0 µg), pH 4,5 (0,3 µg), pH 4,0 (0,2 µg), pH 4,0 NaCl (0,2 µg). Plasma, E1 e E2 diluídos 20 x, demais amostras sem diluição.

5.2.4 Experimento 3 – pH 6,0, 5,5, 5,0 e 4,0

Para realização deste experimento diluímos a amostra com Tampão Citrato de sódio 4 mM, pH 6,0. A concentração do citrato foi ajustada para ficar com a mesma condutividade do Tampão Tris-HCl 20 mM de 965 µS/cm, que foi o tampão

que utilizamos no primeiro experimento 1. Para as demais etapas de eluição foram utilizados tampões acetato de sódio 20 mM, em pH 5,5, 5,0 e 4,0.

Na Figura 47 podemos observar o perfil cromatográfico desta purificação e na Tabela 34 a concentração de proteínas nas frações.

Figura 47 – Cromatograma do Experimento 3.

O FT proveniente da purificação em ANX Sepharose FF foi diluído 10 vezes e aplicado na coluna Q Sepharose FF em pH 6,0. A detecção foi feita em UV 280 nm. Foi realizado um gradiente de pH em step com pH 5,5, 5,0, e 4,0.

Tabela 34 – Concentração de proteína nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 3.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
Entrada	5,65	30,45	172,1
Entrada diluída	33,33	4,88	162,6
FT	159,68	0,20	31,9
Reequilíbrio	319,32	0,05	15,6
pH 5,5	228,3	0,13	30,4
pH 5,0	228,3	0,09	21,6
pH 4,0	228,3	0,20	45,6

Em comparação com o primeiro experimento, em que os tampões também estavam com concentração 20 mM, com a diminuição do pH inicial para 6,0, a IgG foi somente observada no FT (Figura 48C), isto é, não foi adsorvida à coluna. A IgM

e a IgA foram detectadas por western blot principalmente em pH 4,0 (Figuras 48B e 48D). A albumina foi observada em todas as frações coletadas, incluindo o FT (Figura 48A).

Uma vez que a IgG saiu no FT, a IgM e a IgA foram adsorvidas à coluna e a maior parte da albumina também, realizamos uma purificação em pH 6,0 eluindo seletivamente estas proteínas através de gradiente salino.

Figura 48 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA nas frações obtidas na purificação em Q Sepharose FF – Experimento 3.

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular, E1 = Entrada, E2 = Entrada diluída 10 vezes, (A) (B) (C) (D) Plasma (32,8 µg), Entrada (18,3 µg), Entrada diluída (2,9 µg), FT (2,4 µg), Reequilíbrio (0,6 µg), pH 5,5 (1,6 µg), pH 5,0 (1,1 µg), pH 4,0 (2,4 µg). Plasma, E1, E2 diluídos 20 x, demais amostras sem diluição.

5.2.5 Experimento 4 – gradiente de NaCl em pH 6,0

Para a realização deste experimento utilizamos o mesmo tampão de equilíbrio utilizado no Experimento 3, ou seja, Tampão Citrato de sódio 4 mM, pH 6,0. Para o gradiente linear foram utilizados tampões acetato de sódio 20 mM, em pH 6,0 e acetato de sódio 20 mM, em pH 6,0 com NaCl 500 mM. Ao atingir 100 % passamos mais 5 VC do tampão contendo NaCl para lavar a coluna. A eluição das proteínas foi recolhida em frações de 10 mL e a lavagem foi recolhida em uma única fração separadamente.

Na Figura 49 podemos observar a eluição de 2 picos principais que não estão totalmente separados.

Figura 49 – Cromatograma do Experimento 4.

O FT proveniente da purificação em ANX Sepharose FF foi diluído 10 vezes e aplicado na coluna Q Sepharose FF em pH 6,0. A detecção foi feita em UV 280 nm. Foi realizado um gradiente linear de NaCl de 0 a 500 mM. As amostras foram recolhidas em frações de 10 mL.

A Tabela 35 e a Figura 50 mostram a concentração de proteína e a quantidade de proteína total nas frações da purificação. Observa-se que aproximadamente 27% das proteínas não são adsorvidas à coluna, sendo recolhidas no FT e no Reequilíbrio e 60 % das proteínas foram adsorvidas.

Tabela 35 – Concentração de proteína nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 4.

Amostras	Concentração média de NaCl nas frações (mM)	Volume da fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
Entrada sem diluição	-	5,65	38,31	216,4
Entrada com diluição	-	33,33	5,98	199,4
FT	-	152,5	0,26	39,7
Reequilíbrio	-	319,9	0,04	14,0
Fração 1	-	10	0,09	0,9
Fração 2	-	10	0,26	2,6
Fração 3	9,5	10	3,64	36,4
Fração 4	27,2	10	3,18	31,8
Fração 5	42,7	10	1,78	17,8
Fração 6	57,5	10	0,92	9,2
Fração 7	72,2	10	0,59	5,9
Fração 8	86,5	10	0,52	5,2
Fração 9	100	10	0,46	4,6
Fração 10	118	10	0,45	4,5
Fração 11	148	10	0,44	4,4
Fração 12	184	10	0,38	3,8
Fração 13	218	10	0,30	3,0
Fração 14	252	10	0,25	2,5
Fração 15	283	10	0,18	1,8
Fração 16	307	10	0,08	0,8
Fração 17	329	10	0,06	0,6
Fração 18	350	10	0,04	0,4
Fração 19	370	10	0,02	0,2
Fração 20	390	10	0,02	0,2
Fração 21	411	10	0,01	0,1
Fração 22	431	10	0,01	0,1
Fração 23	447	10	0,00	0,0
500 mM	-	228,3	0,02	4,1

Figura 50 – Proteína total nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 4.

A figura 51A mostra que parte da albumina encontra-se no FT e parte encontra-se adsorvida à coluna, com concentração máxima na fração 3, o que corresponde ao pico 1, em que concentração de NaCl no tampão era de 10 mM.

Pela análise de western blot observamos que a IgM foi detectada nas frações 6 a 22, e com maior intensidade entre as frações 9 a 12 (Figura 51B), que é a região do segundo pico do cromatograma. Se considerarmos que o ponto máximo do segundo pico do cromatograma, abrange as frações 10 e 11, onde a concentração de NaCl era aproximadamente 150 mM, então para eluirmos totalmente a IgM seria necessário cerca de 300 a 400 mM, que é a concentração que utilizamos para eluir a IgM da troca aniônica na Estratégia 1.

A IgG foi detectada principalmente no FT, mas podemos ver bandas de leve intensidade nas frações 6 a 14 (Figura 51C). A IgA foi detectada em todas as frações, inclusive no FT (Figura 51D).

Portanto, neste experimento, a IgG foi detectada no FT, a IgM no segundo pico do gradiente salino e a IgA e a albumina em todas as frações coletadas, inclusive o FT.

Considerando os resultados obtidos até aqui, o experimento seguinte foi desenhado considerando-se que para que a albumina fosse totalmente adsorvida à coluna, a purificação teria que iniciar em pH maior que 6,0; Para que a IgG não fosse adsorvido à coluna, a condutividade das soluções teria que ser maior que a dos tampões 20 mM. A eluição da albumina seria em pH 5,5 e a da IgM poderia ser

tanto diminuindo o pH para 5,0, como com NaCl 300 mM. Em nenhum os protocolos testados, em que se variou o pH e a concentração dos tampões, foi possível separar a IgA da IgM. Portanto, não seria possível separar IgM de IgA empregando coluna de troca aniônica Q Sepharose FF.

Figura 51 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA nas frações obtidas na purificação em Q Sepharose FF – Experimento 4.

(D)

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular, E1 = Entrada, E2 = Entrada diluída 17 vezes, **(A) (B) (C) (D)** Plasma (32,8 µg), Entrada (23 µg), Entrada diluída (7,2 µg), FT (0,3 µg), Reequilíbrio (0,5 µg), Fração 1 (1,1 µg), Fração 2 (3,2 µg), Fração 3 (4,4 µg), Fração 4 (3,8 µg), Fração 5 (2,1 µg), Fração 6 (11,1 µg), Fração 7 (7 µg), Fração 8 (6,2 µg), Fração 9 (5,5 µg), Fração 10 (5,4 µg), Fração 11 (5,3 µg), Fração 12 (4,6 µg), Fração 13 (3,6 µg), Fração 14 (3,0 µg), Fração 15 (2,2 µg), Fração 16 (1 µg), Fração 17 (0,7 µg), Fração 18 (0,5 µg), Fração 19 (0,3 µg), Fração 20 (0,2 µg), Fração 21 (0,1 µg), Fração 22 (0,1 µg), 500 mM (0,2 µg). E1 diluído 20 x, E2, FT, Frações 3, 4 e 5 diluídos 10 x, demais amostras sem diluição.

5.2.6 Experimento 5 – pH 8,0, pH 5,5, pH 5,5 com NaCl 300 mM

Neste experimento retomamos a algumas condições experimentais do Experimento 2: o pH da amostra, diluída 10 vezes, foi ajustada para 8,0 e a concentração dos tampões foi de 100 mM. Para eluir as proteínas adsorvidas, realizamos uma etapa de gradiente de pH (pH 5,5) e uma etapa de gradiente salino (NaCl 300 mM).

Os resultados desta purificação estão mostrados na Figuras 52 , 53 e 54 e Tabela 36 .

A IgG foi recuperada no FT (Figuras 54A e 54C). A albumina foi recuperada na fração pH 5,5 (Figura 54A), correspondendo ao maior pico do cromatograma e 50% das proteínas recuperadas (Figura 52). A IgM e a IgA foram recuperadas na fração que eluiu na presença de NaCl 300 mM (Figuras 54B e 54D).

Apenas na Figura 54A mostramos o FT concentrado 10 vezes. Pela análise do western blot, podemos observar que a IgM foi toda eluída com o tampão contendo NaCl 300 mM (Figura 54B). A IgG foi recuperada toda no FT (Figura 54C). A IgA foi detectada em grande parte juntamente com a IgM, mas uma banda de leve intensidade pode ser vista no pH 5,5 (Figura 54D).

Figura 52 – Cromatograma do Experimento 5.

O FT proveniente da purificação em ANX Sepharose FF foi diluído 10 vezes e aplicado na coluna Q Sepharose FF em pH 8,0. A detecção foi feita em UV 280 nm. Foi realizado um gradiente de pH em step com pH 5,5, 5,5 com NaCl 300 mM, e 5,5 NaCl 500 mM.

Os resultados obtidos corroboram com os da literatura em que a IgG liga-se mais fracamente à coluna de troca aniônica que a albumina, sendo recolhida no FT, enquanto a albumina é adsorvida (FOURCART et al., 1982). Um perfil semelhante também foi descrito por Grellet et al., (2001) na purificação IgG e albumina a partir de placenta humana. Em nossos experimentos da Estratégia 1, a albumina e a IgG não são adsorvidas nas condições empregadas, enquanto a IgM e a IgA são adsorvidas nas colunas de troca aniônica Q Sepharose FF e ANX Sepharose FF devido às diferenças de pH e condutividade. Todas as informações da literatura, juntamente com os resultados obtidos anteriormente, nos levaram a desenhar essa estratégia em que conseguimos separar em uma única coluna a albumina, a IgG e a IgM. Todos esses resultados mostram que pequenas variações na concentração do tampão ou no pH ou na condutividade da amostra pode levar a resultados totalmente diferentes.

O tampão Tris, que tem sido usado para diluir a amostra inicial e ajustar o pH para 8,0, não é um tampão frequentemente usado em processos devido ao seu alto custo. Para avaliarmos a possibilidade de usar um sal de menor custo, mas mantendo o perfil de purificação, testamos o uso da solução de acetato de sódio pH 8,0 para a diluição inicial.

Tabela 36 – Concentração de proteína nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 5.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
Entrada	5,65	31,60	178,6
Entrada diluída	33,33	5,04	167,8
FT	170,70	0,07	11,2
Reequilíbrio	319,24	0,00	1,1
pH 5,5	368,01	0,25	90,8
pH 5,5, NaCl 300 mM	228,3	0,09	21,2
pH 5,5 NaCl 500 mM	228,3	-0,02	-

Figura 53 – Proteína total nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 5.

Figura 54 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA nas frações obtidas na purificação em Q Sepharose FF – Experimento 5.

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular, E1 = Entrada, E2 = Entrada diluída 10 vezes, **(A) (B) (C) (D)** Plasma (32,8 µg), Entrada (19 µg), Entrada diluída (6,0 µg), FT (0,8 µg), Reequilíbrio (0,04 µg), pH 5,5 (3,0 µg), pH 5,5 NaCl 300 mM (1,1 µg); Plasma, E1 e E2 diluídos 20x, demais amostras sem diluição; **(A)** FT concentrado 10x (8 µg).

5.2.7 Experimento 6 – Diluição da amostra e equilíbrio da coluna com solução de acetato de sódio em pH 8,0 e mesmo gradiente do experimento 5: pH 8,0, pH 5,5 e pH 5,5 com NaCl 300 mM

Para a realização deste experimento testamos a utilização da solução de acetato de sódio 70 mM, pH 8,0 para diluir a amostra de entrada da coluna. A concentração do tampão acetato de sódio foi ajustada para 70 mM para o valor da condutividade ficar próximo do tampão Tris-HCl 100 mM de 5 mS/cm.

Na Figura 55, podemos observar que perfil cromatográfico ficou semelhante ao do experimento anterior, isto é, foram eluídos 3 picos principais. Na Tabela 37 e na Figura 56 observamos a distribuição das proteínas nas frações coletadas.

Figura 55 – Cromatograma do Experimento 6.

O FT proveniente da purificação em ANX Sepharose FF foi diluído 10 vezes e aplicado na coluna Q Sepharose FF em pH 8,0, utilizando tampão acetato de sódio 70 mM. A detecção foi feita em UV 280 nm. Foi realizado um gradiente de pH em step com pH 5,5, 5,5 com NaCl 300 mM, e 5,5 NaCl 500 mM.

Tabela 37 – Concentração de proteína nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 6.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
Entrada	5,7	35,4	200,2
Entrada diluída	33,3	5,3	178,4
FT	169,5	0,11	18,8
Reequilíbrio	320,5	0,01	3,3
pH 5,5	303,3	0,28	85,5
pH 5,5, NaCl 300 mM	228,3	0,12	28,4
pH 5,5 NaCl 500 mM	228,3	0	-

Figura 56 - Proteína total nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 6.

A análise das frações cromatográficas através de gel de poliacrilamida e western blots (Figura 57) indica que o perfil de separação das proteínas analisadas não se alterou com o uso da solução de acetato para diluir a amostra de entrada: a IgG eluiu no FT, a albumina quando diminuímos o pH de 8,0 para 5,5 e a IgM e IgA eluíram na presença de NaCl 300 mM.

A quantificação das imunoglobulinas pelo método turbidimétrico mostra que 84,1% da IgM foi recuperada na fração eluída com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5, contendo NaCl 300 mM (Tabela 38). O fator de purificação da IgM foi de 5,3 vezes.

Trinta e oito por cento de IgG foi recuperada no FT, com fator de purificação de 3,6 vezes (Tabela 39). A recuperação de IgA foi de 52,4% na mesma fração da IgM, ou seja, na fração eluída com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5, contendo NaCl 300 mM (Tabela 40). O fator de purificação da IgA foi de 3,3 vezes. A baixa recuperação de IgG e IgA pode ser devido à manipulação das amostras para a realização do teste turbidimétrico, pois foi necessário concentrar as amostras 10 vezes para a realização do teste.

Figura 57 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA nas frações obtidas na purificação em Q Sepharose FF – Experimento 6.

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular, E1 = Entrada, E2 = Entrada diluída 10 vezes, **(A) (B) (C) (D)** Plasma (32,8 µg), Entrada (21,3 µg), Entrada diluída (6,4 µg), FT (1,3 µg), Reeq (0,1 µg), pH 5,5 (3,4 µg), pH 5,5 NaCl 300 mM (1,5 µg). Plasma, E1 e E2 diluídos 20 x, demais amostras sem diluição. Em **(A)**, FTa = FT sem concentrar, FTb = FT concentrado 10 x (13 µg).

Até o momento aplicamos cerca de 200 mg de proteína em uma coluna de 46 mL, isto é, 4,3 mg de proteína/mL de resina. Este valor é bem pequeno, considerando que a capacidade da Q Sepharose FF de adsorver a albumina humana é de 120 mg/mL, segundo o fabricante da resina, e que esta proteína corresponde a metade das proteínas presentes na nossa amostra. Em volume de plasma purificado, se considerarmos que a concentração de proteínas no plasma é de 60 mg/mL, 200 mg de proteína corresponde a 3,3 mL de plasma, o que equivale a 0,072 VC de plasma. Com esta quantidade de amostra foi possível estudar as purificações em uma condição muito abaixo da saturação da coluna, para facilitar a

análise dos resultados. Uma vez definida as condições de purificação, no experimento seguinte, aumentamos a quantidade de amostra aplicada à coluna, a fim de aumentar a concentração de proteínas coletadas e possibilitar a análise direta das amostras e quantificação das imunoglobulinas por turbidimetria

Tabela 38 – Dosagem de IgM nas frações da purificação do FT, proveniente da purificação de plasma em ANX Sepharose FF, em Q Sepharose FF – Experimento 6.

Amostras	Volume (mL)	Concentração IgM (mg/mL)	IgM Total (mg)	Recuperação (%)	Proteína total (mg)	Conteúdo específico (mg IgM/mg proteína)	Fator de purificação
Entrada	5,7	0,47	2,68	-	200,2	-	-
Entrada diluída	33,3	0,08	2,68	100	178,4	0,02	-
FT*	169,5	0,01	-	-	18,8	-	-
Reequilíbrio*	320,5	0	-	-	3,3	-	-
pH 5,5*	303,2	0,00	-	-	85,5	-	-
pH 5,5 NaCl 300*	228,3	0,10	2,25	84,1	28,4	0,08	5,3
pH 5,5 NaCl 500*	228,3	0,02	-	-	-0,7	-	-

*as amostras foram concentradas 10 vezes para realização desse teste.

Tabela 39 – Dosagem de IgG nas frações da purificação do FT, proveniente da purificação de plasma em ANX Sepharose FF, em Q Sepharose FF – Experimento 6.

Amostras	Volume (mL)	Concentração IgG (mg/mL)	IgG Total (mg)	Recuperação (%)	Proteína total (mg)	Conteúdo específico (mg IgG/mg proteína)	Fator de purificação
Entrada	5,7	4	26,44	-	200,2	-	-
Entrada diluída	33,3	0,80	26,55	100	178,4	0,15	-
FT*	169,5	0,59	9,96	37,5	18,8	0,53	3,6
Reequilíbrio*	320,5	0,07	-	-	-	-	-
pH 5,5*	303,2	0,09	-	-	85,5	-	-
pH 5,5 NaCl 300*	228,3	0,09	-	-	28,4	-	-
pH 5,5 NaCl 500*	228,3	0,00	-	-	-	-	-

*as amostras foram concentradas 10 vezes para realização desse teste.

Tabela 40 – Dosagem de IgA nas frações da purificação do FT, proveniente da purificação de plasma em ANX Sepharose FF, em Q Sepharose FF – Experimento 6.

Amostras	Volume (mL)	Concentração IgA (mg/mL)	IgA Total (mg)	Recuperação (%)	Proteína total (mg)	Conteúdo específico (mg IgA/mg proteína)	Fator de purificação
Entrada	5,7	1,69	9,53	-	200,2	-	-
Entrada diluída	33,3	0,30	9,95	100	178,4	0,06	-
FT*	169,5	-0,01	-	-	18,8	-	-
Reequilíbrio*	320,5	-0,03	-	-	3,3	-	-
pH 5,5*	303,2	0,00	-	-	85,5	-	-
pH 5,5 NaCl 300*	228,3	0,23	5,22	52,4	28,4	0,18	3,3
pH 5,5 NaCl 500*	228,3	0,03	-	-	-	-	-

*as amostras foram concentradas 10 vezes para realização desse teste.

5.2.8 Experimento 7 – repetição do gradiente 6 com aplicação de maior quantidade de amostra

Neste experimento, aplicamos 1,6 g de proteína à coluna. Embora a quantidade de proteína aplicada seja bem maior que a usada nos experimentos anteriores (200 mg), fazendo-se o cálculo tomando como referência a capacidade de adsorção de albumina, ainda estaríamos muito aquém da saturação. Se considerarmos que a capacidade de adsorção da albumina é de 120 mg/mL, uma coluna de 46 mL tem capacidade para adsorver 5,5 g desta proteína.

O cromatograma desta purificação encontra-se na Figura 58. A Figura 59 mostra que o perfil de proteínas dos dados da Tabela 41 é muito semelhante ao obtido nos experimentos anteriores, em que empregamos as mesmas condições de eluição.

Figura 58 – Cromatograma do Experimento 7.

O FT proveniente da purificação em ANX Sepharose FF foi diluído 10 vezes e aplicado na coluna Q Sepharose FF em pH 8,0, utilizando tampão acetato de sódio 70 mM. A detecção foi feita em UV 280 nm. Foi realizado um gradiente de pH em step com pH 5,5, 5,5 com NaCl 300 mM, e 5,5 NaCl 500 mM.

Tabela 41 – Concentração de proteína nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 7.

Amostras	Volume da fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
Entrada	45	36,86	1659
Entrada diluída	265,5	5,92	1572
FT	402,7	0,58	235
Reequilíbrio	319,2	0,12	37,6
pH 5,5	228,3	3,17	725
pH 5,5 NaCl 300	228,3	0,86	196
pH 5,5 NaCl 500	228,3	-	0,8

Figura 59 – Proteína total nas frações da purificação em Q Sepharose FF – Experimento 7.

Os resultados da análise por gel de poliacrilamida e westernblot indicam as proteínas analisadas eluíram nas frações esperadas. (Figura 60). A IgG foi encontrada majoritariamente no FT (Figuras 60A e 60C), a albumina na fração em que o pH foi para 5,5 (Figura 60A) e a IgM e IgA na fração com NaCl 300 mM (Figura 60B).

Figura 60 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM, IgG e IgA nas frações obtidas na purificação em Q Sepharose FF – Experimento 7.

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular, E1 = Entrada, E2 = Entrada diluída 10 vezes, **(A) (B) (C) (D)** Plasma (32,8 µg), Entrada (22,1 µg), Entrada diluída (7,1 µg), FT (7,0 µg), Reequilíbrio (1,4 µg), pH 5,5 (3,8 µg), pH 5,5 NaCl 300 mM (10,3 µg). Plasma, E1, E2 diluídos 20 x, pH 5,5 diluído 10 x, demais amostras sem diluição.

A análise turbidimétrica mostrou que 87,8% da IgM foi recuperada na fração eluída com tampão acetato de sódio 100 mM, contendo NaCl 300 mM, pH 5,5 (Tabela 42), com fator de purificação de 7 vezes, 78,3% de IgG foi recuperada no FT

(Tabela 43), com fator de purificação de 5,2 vezes e 82,5% e a IgA foi também recuperada na fração eluída com tampão acetato de sódio 100 mM, contendo NaCl 300 mM, pH 5,5 (Tabela 44), com fator de purificação de 6,6 vezes.

Em relação à saturação da coluna, a principal indicação de que a coluna estava saturada foi o aparecimento de bandas no FT, diminuindo a pureza da IgG. Esta observação foi confirmada pela análise comparativa das frações de IgG e albumina dos experimentos 5, 6 e 7, por densitometria, que serão mostrados no item 5.2.11. A presença de bandas fracas de IgM e IgA no FT corroboram com esta observação, embora estas bandas pudessem não ter sido vistas anteriormente devido à menor concentração de proteínas presente nas frações das purificações anteriores. Portanto, os cálculos feitos tomando como referência a capacidade de adsorção de albumina estavam superestimados. A aplicação de 1,6 g de proteína corresponde à quantidade de proteína presente em 27 mL de plasma, levando-se em consideração que a concentração de proteínas no plasma é de 60 mg/mL. Como a coluna utilizada neste experimento tinha 46 mL, foram aplicados 0,6 VC de plasma. Concluimos que a capacidade de purificação nas condições experimentais empregadas é menor que 0,6 VC inicial de plasma.

Tabela 42 – Dosagem de IgM nas frações da purificação do FT, proveniente da purificação de plasma em ANX Sepharose FF, em Q Sepharose FF – Experimento 7.

Amostras	Volume (mL)	Concentração IgM (mg/mL)	IgM Total (mg)	Recuperação (%)	Proteína total (mg)	Conteúdo específico (mg IgM/mg proteína)	Fator de purificação
Entrada	45	0,58	26,30	-	1658	-	-
Entrada diluída	265,5	0,09	25,01	100	1572	0,02	-
FT	402,7	0,00	-	-	235	-	-
Reequilíbrio	319,2	0,00	-	-	37,6	-	-
pH 5,5	228,3	0,02	-	-	725	-	-
pH 5,5 NaCl 300	228,3	0,10	21,96	87,8	196	0,11	7,0
pH 5,5 NaCl 500	228,3	0,01	-	-	0,8	-	-

Tabela 43 – Dosagem de IgG nas frações da purificação do FT, proveniente da purificação de plasma em ANX Sepharose FF, em Q Sepharose FF – Experimento 7.

Amostras	Volume (mL)	Concentração IgG (mg/mL)	IgG Total (mg)	Recuperação (%)	Proteína total (mg)	Conteúdo específico (mg IgG/mg proteína)	Fator de purificação
Entrada	45	4,51	202,85	-	1658	-	-
Entrada diluída	265,5	0,74	195,73	100	1572	0,12	-
FT	402,7	0,38	153,18	78,3	235	0,65	5,2
Reequilíbrio	319,2	0,10	-	-	37,6	-	-
pH 5,5	228,3	0,15	-	-	725	-	-
pH 5,5 NaCl 300	228,3	0,04	-	-	196	-	-
pH 5,5 NaCl 500	228,3	-0,02	-	-	0,8	-	-

Tabela 44 – Dosagem de IgA nas frações da purificação do FT, proveniente da purificação de plasma em ANX Sepharose FF, em Q Sepharose FF – Experimento 7.

Amostras	Volume (mL)	Concentração IgG (mg/mL)	IgG Total (mg)	Recuperação (%)	Proteína total (mg)	Conteúdo específico (mg IgA/mg proteína)	Fator de purificação
Entrada	45	0,58	26,01	-	1658	-	-
Entrada diluída	265,5	0,10	26,28	100	1572	0,02	-
FT	402,7	-0,01	-	-	235	-	-
Reequilíbrio	319,2	-0,01	-	-	37,6	-	-
pH 5,5	228,3	0,01	-	-	725	-	-
pH 5,5 NaCl 300	228,3	0,10	21,69	82,5	196	0,11	6,6
pH 5,5 NaCl 500	228,3	0,00	-	-	0,8	-	-

Os resultados de dosagem proteínas por Bradford e das imunoglobulinas por turbidimetria na fração 300 mM, resumidos na Tabela 45, mostram que o conteúdo em massa de IgM foi de 11,2% e IgA foi de 11,0%, totalizando 22,2% em massa das proteínas totais. Não foi detectada IgG nessa fração. Esse resultado indica que essa fração ainda apresenta muitas impurezas em relação ao conteúdo de imunoglobulinas.

Para verificar a possibilidade de aumentar a pureza de IgM, foi realizado um estudo empregando as colunas de gel filtração Sepharose 4 FF e Sephacryl S300.

Tabela 45 - Conteúdo de imunoglobulinas na fração eluída da coluna Q Sepharose FF – Experimento 7.

	Conteúdo na fração 300 mM (mg)	Imunoglobulinas na fração 300 mM (%)
Proteína Total	196	-
IgM	21,96	11,20
IgG	-	-
IgA	21,69	11,07
Total	43,65	22,27

5.2.9 Separação de IgM e IgA por Sepharose 4FF

Visando separar a IgA da amostra de IgM empregamos a coluna de gel filtração Sepharose 4FF, também usada na Estratégia 1 deste trabalho. Neste experimento aplicamos 20 mL (cerca de 16 mg de proteína) do eluato da Q Sepharose FF (tampão acetato, NaCl 300 mM, pH 5,5) do experimento 7 na coluna Sepharose, 4 FF e foram recolhidas frações de 10 mL.

Os resultados de dosagem de proteínas (Figura 61 e Tabela 46), de análise em gel de poliacrilamida e western blot (Figura 62) mostram que a IgM e a IgA não foram separadas na coluna Sepharose 4FF (Figuras 62B e 62C). Uma explicação para este resultado seria a presença de agregados de IgA, uma vez que o volume de eluição do pico é o de IgM.

Figura 61 – Perfil proteico das frações coletadas na purificação em Sepharose 4 FF para separação de IgM e IgA.

Tabela 46 – Concentração de proteínas nas frações da purificação em Sepharose 4 FF para separação de IgM e IgA.

Amostras	Volume da fração (mL)	Volume inicial da fração no cromatograma (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
pH 5,5 NaCl 300 mM	20	-	0,81	16,2
Fração 1	10	67,5	0,00	0,01
Fração 2	10	77,5	0,00	0,01
Fração 3	10	87,5	0,00	0,01
Fração 4	10	97,5	0,00	0,02
Fração 5	10	107,5	0,00	0,02
Fração 6	10	117,5	0,00	0,00
Fração 7	10	127,5	0,00	0,01
Fração 8	10	137,5	0,00	0,04
Fração 9	10	147,5	0,00	0,04
Fração 10	10	157,5	0,00	0,04
Fração 11	10	167,5	0,01	0,1
Fração 12	10	177,5	0,02	0,2
Fração 13	10	187,5	0,04	0,4
Fração 14	10	197,5	0,05	0,5
Fração 15	10	207,5	0,09	0,9
Fração 16	10	217,5	0,13	1,3
Fração 17	10	227,5	0,16	1,6
Fração 18	10	237,5	0,21	2,1
Fração 19	10	247,5	0,24	2,4
Fração 20	10	257,5	0,24	2,4
Fração 21	10	267,5	0,20	2,0
Fração 22	10	277,5	0,12	1,2
Fração 23	10	287,5	0,06	0,6
Fração 24	10	297,5	0,03	0,3
Fração 25-33	90	307,5	0,00	0,2

Figura 62 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras e análise da presença de IgM **(B)** e IgA **(C)** nas frações obtidas na purificação Sepharose 4 FF para separação de IgM e IgA.

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular, E = amostra de partida, eluída com pH 5,5 NaCl 300 mM do experimento 7, **(A)** **(B)** **(C)** Foram aplicados 12 μ L de todas as frações.

5.2.10 Separação de IgM e IgA por gel filtração Sephacryl S300

Neste experimento aplicamos 6,6 mL da amostra (2% do VC), do eluato de Q Sepharose FF do Experimento 7. Utilizamos o tampão acetato de sódio 100 mM, NaCl 300 mM, pH 5,5 para eluição das proteínas e coletamos frações de 1 mL.

O cromatograma da purificação é apresentado na Figura 63.

Figura 63 - Cromatograma da purificação da fração pH 5,5 NaCl 300 mM em Sephacryl S300.

A fração pH 5,5 NaCl 300 mM foi aplicada à coluna Sephacryl S300 e os tubos foram recolhidos a cada 1 ml. A detecção foi feita em UV 280 nm.

Analisando o cromatograma observamos que as proteínas foram eluídas a partir de 130 mL. A análise das frações por SDS-PAGE e western blot foi feita a partir da fração 130 e a cada 5 amostras. A análise por western blot mostra que a IgM foi encontrada principalmente entre as frações 135 e 165 (Figura 64B). A IgA foi detectada entre as frações 145 e 225 (Figura 64C). Dessa forma, observamos que houve uma separação porém não total entre IgM e IgA. A faixa de separação desta resina é de 10 kDa a 1500 kDa, estando as 2 proteínas, IgM (950 kDa) e IgA (150 kDa), incluídas nesta faixa. A separação parcial destas proteínas indica que na amostra estão presentes aglomerados de IgA. É importante observar que é possível ainda melhorar as condições de separação, por exemplo, diminuindo o fluxo de trabalho, uma vez que foi usado o fluxo máximo recomendado pelo fabricante da resina. Além disso, a adição de reagentes que interferem na interação entre as cadeias proteicas, impedindo a formação de aglomerados, como a arginina, ao tampão da fase móvel, podem otimizar a separação (EJIMA et al., 2005; KHEDDO et al., 2014; NEZLIN, 2010.).

Considerando que a IgM eluiu entre as frações 131 e 165, para obtermos uma IgM mais pura, reunimos os tubos 131 a 150 separadamente dos tubos 151 a 165. A análise destas frações por gel poliacrilamida está apresentado na Figura 65. A

análise por densitometria do “pool” obtido pela reunião das frações 131 a 150 indica que a IgM foi recuperada com aproximadamente 52% de pureza (Figura 66). Não foi possível dosar a IgM método turbidimétrico devido à baixa concentração de proteína.

Figura 64 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras **(A)**, análise da presença de IgM **(B)** e análise da presença de IgA **(C)** das frações obtidas na purificação da fração pH 5,5 NaCl 300 mM em Sephacryl S300.

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular. E = amostra de partida, eluída com pH 5,5 NaCl 300 mM do experimento 7. Todas as amostras foram aplicadas sem diluição (12 μ L).

Figura 65 - Gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras das frações obtidas na purificação da fração pH 5,5 NaCl 300 mM em Sephacryl S300.

Canaletas: MM = Padrão de Massa Molecular. As amostras 131-150 e 151-165 foram precipitadas com acetona e ressuspensas diretamente no Tampão de amostra 1x (15 μ L). Desta forma, concentramos as amostras 33 vezes.

Figura 66 – Densitometria da fração contendo IgM da purificação em Sephacryl S300.

Foi realizada a densitometria da amostra eluída da coluna Sephacryl S300, considerando as cadeias pesada e leve da IgM em relação ao lane total. Foi aplicado 15 μ L da amostra concentrada 33 x.

5.2.11 Comparação das amostras de IgG e albumina

Nesse nosso estudo o foco foi a purificação de IgM. No entanto, não podemos deixar de destacar os resultados em relação à purificação de IgG e albumina.

A Figura 67 mostra a pureza da IgG obtida nos 3 últimos experimentos em comparação com um produto comercial.

Na Figura 67A observamos o perfil do padrão de IgG Sandoglobulina® Privigen®, da CSL Behring. A bula do medicamento informa que o produto contém pelo menos 98% de IgG.

Na Figura 67B observamos o perfil de IgG do Experimento 5, em que utilizamos o tampão Tris-HCl em pH 8,0 para equilibrar a coluna e diluir a amostra. Na Figura 67C observamos o perfil da IgG do Experimento 6, em que utilizamos tampão acetato de sódio em pH 8,0 ao invés do tampão Tris-HCl. A pureza dessas amostras é comparável ao do padrão Sandoglobulina® Privigen®.

E por fim, na Figura 67D observamos que com o aumento da quantidade de amostra aplicada, apareceram 2 bandas fortes, que não eram visíveis nos experimentos anteriores, que podem ter contaminado a IgG devido à saturação da coluna, diminuindo significativamente a pureza de IgG.

Figura 67 – Análise da pureza de IgG nos géis de poliacrilamida por densitometria.

Foi realizada a densitometria de cada amostra considerando as cadeias pesada e leve da IgG em relação ao lane total. **(A)** IgG comercial Privigen® (4 µg), **(B)** FT do Experimento 5, em que iniciamos o experimento com tampão Tris-HCl em pH 8,0 (8,4 µg), **(C)** FT do Experimento 6, em que iniciamos o experimento com tampão Acetato de sódio em pH 8,0 (13,2 µg), **(D)** FT do Experimento 7, em que iniciamos o experimento com tampão Tris-HCl em pH 8,0 e aplicamos mais amostra (7 µg).

A Figura 68 mostra a pureza da albumina obtida nos 3 últimos experimentos.

Na Figura 68A observamos o perfil da albumina do Experimento 5, em que utilizamos o tampão Tris-HCl em pH 8,0 para equilibrar a coluna e diluir a amostra. A pureza da albumina foi de 92,2%.

Na Figura 68B observamos o perfil da albumina do Experimento 6, em que utilizamos tampão acetato de sódio em pH 8,0 ao invés do tampão Tris-HCl. A pureza da albumina foi de 93,2%, sendo muito próxima ao do experimento anterior.

E por fim, na Figura 68C observamos que com o aumento da quantidade de amostra aplicada, a pureza da albumina diminuiu para 75,5%.

Com base nesses resultados, podemos afirmar que conseguimos obter uma amostra de IgG com perfil bastante comparável ao produto comercial em apenas 1 etapa de purificação e uma amostra de albumina com pureza acima de 90%.

Figura 68 - Análise da pureza de albumina nos géis de poliacrilamida por densitometria.

Foi realizada a densitometria de cada amostra considerando a banda da albumina em relação ao lane total. **(A)** pH 5,5 do Experimento 5, em que iniciamos o experimento com tampão Tris-HCl em pH 8,0 (3,0 µg), **(B)** pH 5,5 do Experimento 6, em que iniciamos o experimento com tampão Acetato de sódio em pH 8,0 (3,4 µg), **(D)** pH 5,5 do Experimento 7, em que iniciamos o experimento com tampão Tris-HCl em pH 8,0 e aplicamos mais amostra (3,8).

5.2.12 Discussão Geral da Estratégia 2 da purificação de IgM

A Estratégia 2 foi desenhada para iniciar a purificação de IgM a partir do FT da purificação de plasma em coluna ANX Sepharose FF, em que os fatores de coagulação FVIII e proteínas dependentes de vitamina K foram separados do plasma. Na purificação de plasma em ANX Sepharose FF, mais de 99% das proteínas presentes no plasma estão presentes no FT. Portanto, em comparação à Estratégia 1, em que a purificação de IgM foi estudada visando também a separação das imunoglobulinas IgG e IgA, para Estratégia 2 foi necessário ainda levar em

consideração a separação de albumina, por esta proteína, que representa 50% das proteínas do plasma, estar presente na amostra.

Alguns trabalhos descritos na literatura visam a purificação de IgG e albumina (FOURCART et al., 1982; GRELLET et al., 2001; VARGAS et al., 2012), mas não há nenhuma descrição conhecida com foco na purificação de IgM. Também é conhecida da literatura a separação de IgG de IgM (BREEN et al., 2012; BRNE et al., 2007; WU et al., 2014). A partir destas informações, elaboramos um protocolo visando a separação de IgM, IgG e albumina, empregando gradiente de pH e salino. Os resultados obtidos permitiram chegar ao seguinte protocolo para a primeira etapa de purificação: diluir a amostra 10 x com o tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 e eluir a albumina com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 e a IgM com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5, contendo NaCl 300 mM. Seguindo este protocolo foi possível separar 3 frações, uma contendo IgG, uma contendo albumina e a terceira contendo IgM. A IgG e a albumina foram recuperados com pureza maior que 90%, enquanto a IgM tinha apenas 20% de pureza. Mesmo assim, é importante notar que a IgM foi recuperada com 87% de rendimento e apresentou fator de purificação de 7 vezes.

Observamos que a diluição da amostra de entrada foi importante para que a IgG fosse totalmente eluída no FT. Alternativamente, poderíamos ter aumentado a diluição da amostra de entrada para que toda IgG pudesse ser adsorvida, mas não seria interessante diminuir ainda mais a condutividade, pois algumas proteínas, incluindo a IgM, poderiam começar a precipitar. O aumento da concentração do tampão de 20 mM para 100 mM também contribuiu para a recuperação de IgG apenas no FT.

Segundo o fabricante, a capacidade de ligação de albumina na resina Q Sepharose FF é de 120 mg/mL. Como nossa coluna tinha 46 mL, poderíamos aplicar 5,4 g de albumina. No entanto, vimos que aplicando cerca de 1,5 g de proteína total do FT da purificação em ANX Sepharose FF, nós excedemos a capacidade de ligação, pois encontramos IgM e IgA, entre outras proteínas não identificadas, no FT. Isso pode ser explicado pelo fato do plasma ser composto por proteínas que tem afinidades diferentes à coluna, e podem dependendo das condições experimentais, como pH e condutividade, serem adsorvidos ou não à coluna. Além disso, ao purificarmos uma mistura de proteínas, temos que levar em consideração que existe uma interação entre elas, aquelas que tem mais afinidade à

resina podem deslocar aquelas com menor afinidade. Nós trabalhamos entre 200 mg e 1,6 g e o ideal provavelmente está entre esses valores e precisa ainda ser determinado.

Em pH 6,0 a albumina foi encontrada em todas as frações, inclusive no FT. A albumina humana apresenta pI de 4,9 (RIBEIRO et al., 2008). Os valores de pH trabalhados (6,0 e 8,0) estavam mais altos do que o pI da albumina e por isso a albumina deveria estar desprotonada (com carga líquida negativa), podendo assim ser ligada à resina com carga positiva. Nos nossos estudos ficou claro que, aplicando a mesma quantidade de proteína, em pH 8,0 toda albumina foi adsorvida, enquanto que em pH 6,0 provavelmente parte da albumina estava protonada e não foi adsorvida à coluna. O perfil de adsorção da albumina em pH em torno de 8,0 está de acordo com os resultados obtidos por Fourcart et al. (1982). Esses autores utilizaram tampão Tris-HCl 25 mM, NaCl 35 mM, pH 8,8 para equilíbrio da coluna e utilizaram a estratégia de aumentar o NaCl para 150 mM e diminuir o pH para 7,5 para eluir a albumina. No entanto, os nossos resultados em pH 6,0 não estão de acordo com o que existe descrito na literatura para purificação de albumina. Tanaka et al., (1998) descreveram a purificação de albumina de plasma humano na coluna DEAE Sepharose FF utilizando tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,2 para equilíbrio da coluna e tampão acetato de sódio 25 mM, pH 4,5 para eluir a albumina. A purificação de albumina a partir de placenta humana também foi obtida com sucesso equilibrando a coluna Q Sepharose FF com tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,75, e eluída com tampão acetato de sódio 30 mM, pH 4,5 (CABRERA-CRESPO et al., 2000; GRELLET et al., 2001). Como temos relatos na literatura mostrando que a albumina é adsorvida em até pH 5,2, provavelmente outro fator pode ter interferido nos nossos experimentos em pH 6,0 para que parte da albumina não tenha sido adsorvida. Um fator importante que também afeta o perfil de adsorção e dessorção das proteínas é o tampão utilizado. Em todos os casos citados da literatura, o tampão utilizado foi o acetato de sódio e nos nossos experimentos em pH 6,0 foi utilizado tampão citrato. Dados recentes do laboratório confirmam que podemos obter resultados diferentes apenas modificando o tampão utilizado.

Apesar do acetato não tamponar em pH 8,0, observamos que os resultados obtidos quando este sal foi usado para diluir a amostra de entrada foram

semelhantes aos encontrados quando utilizamos o tampão Tris-HCl, pH 8,0, indicando que esta estratégia foi eficiente para obtermos o resultado desejado.

A IgM e a IgA eluíram juntas em todas as condições experimentais de pH e salinas testadas em coluna de troca aniônica Q Sepharose FF.

A coluna de gel filtração Sepharose 4 FF não foi eficiente para separar IgM e IgA. Isso pode ter ocorrido devido à formação de agregados de IgA. Embora a IgA presente no plasma esteja na forma de monômero e em secreções esteja na forma de dímero (BRADLEY, 1974), é possível que durante as purificações, as condições a que esta proteína foi submetida possa ter favorecido a formação do dímero.

A coluna de Sephacryl S300 foi eficiente para separar IgM de IgA, e o aumento da pureza de IgM foi significativa, mas a pureza final ainda é baixa, portanto é necessária outra etapa de purificação.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, podemos concluir que:

Estratégia 1

- ✓ A purificação de IgM como subproduto do processo desenhado pela GE Healthcare para o Instituto Butantan é viável. A partir da Fração 2 da purificação de plasma em Sepharose 4 FF, uma fração não utilizada no processo, a IgM foi obtida com 63% de rendimento e fator de purificação de 8 vezes.
- ✓ Foram testadas 4 colunas de troca aniônica: Uma troca aniônica fraca (ANX Sepharose FF), uma troca aniônica forte (Q Sepharose FF), uma coluna monolítica (QA) e uma membrana (Sartobind Q). Todas as colunas foram eficientes para a separação de IgM da IgG. Portanto, a separação foi independente do tipo de coluna.
- ✓ Das 4 colunas testadas, a troca aniônica escolhida para continuar a purificação foi a coluna ANX Sepharose FF. A recuperação de IgM foi de 70% e fator de purificação de 5 vezes.
- ✓ Após purificação de Sepharose 4FF e ANX Sepharose FF, a porcentagem de IgM em relação as imunoglobulinas IgG e IgA foi 4,5 vezes maior que a presente no produto comercial Pentaglobin, indicando que o enriquecimento de IgM obtido em relação às outras imunoglobulinas foi satisfatório.
- ✓ Em relação à pureza, os resultados encontrados empregando diferentes técnicas não concordam. A dosagem das imunoglobulinas por turbidimetria e de proteínas por Bradford indicam que mais de 90% das proteínas presentes na fração são imunoglobulinas. Porém o perfil proteico do gel de poliacrilamida mostra que a IgM não está homogênea, sendo portanto necessária etapa adicional de purificação.
- ✓ Para aumentar a pureza da IgM, testou-se uma coluna de afinidade a metal IMAC-Co²⁺, mas esta não foi eficiente. Será necessário o uso de outras técnicas de purificação.

Estratégia 2

- ✓ A partir de um plasma pobre de fatores de coagulação, empregando uma coluna de Q Sepharose FF foi possível separar uma fração contendo IgM das proteínas mais abundantes do plasma: IgG e albumina.
- ✓ Após estudo sistemático, foi estabelecido uma condição de purificação, que incluiu um degrau de gradiente de pH e um degrau de gradiente salino, na qual a IgM foi recuperada com 87% de rendimento, com fator de purificação de 7 vezes.
- ✓ A análise das 3 frações coletadas mostrou que a IgG e a albumina estavam com uma pureza acima de 90%, mas na fração contendo IgM o conteúdo de imunoglobulinas foi de apenas 20%, embora a proporção entre as imunoglobulinas tenha sido melhor que a obtida na estratégia 1, devido à ausência de IgG nesta fração.
- ✓ Uma segunda coluna foi testada. A coluna de gel filtração Sephacryl S300 empregada separou a IgM de proteínas de menor massa molecular, como a IgA, mas o produto final ainda não estava homogêneo, portanto, será necessário continuar este estudo para se obter uma proteína mais purificada.

REFERÊNCIAS*

BERTOLINI, J.; GOSS, N.; CURLING, J. **Production of plasma proteins for therapeutic use**. London: John & Wiley, 2013, 496 p.

BRASIL LEIS E DECRETOS. **Constituição (1988)**. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado, 1988. 496 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO HOSPITALAR E URGÊNCIA. **Caderno de Informação: sangue e hemoderivados**. 7. ed., Brasília:Ministério da Saúde, 2014. 158 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO HOSPITALAR E URGÊNCIA. **Caderno de Informação: sangue e hemoderivados**. 9. ed., Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 154 p.

BRADLEY, J. Immunoglobulins. **J. Med. Genet.**, v. 11, p. 80-90, 1974.

BREEN, L.; CAO, L.; EOM, K.; GAJDOSIK, M. S.; CAMARA, L.; GIACOMETTI, J.; DUPUY, D. E.; JOSIC, D. High-throughput fractionation of human plasma for fast enrichment of low and high abundance proteins. **Blood Transfus.**, v. 10, suppl 2, p. 89-100, 2012.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de Afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de Biomoléculas: Aspectos Fundamentais e Aplicações Tecnológicas. **Quim. Nova**, v. 32, p.1288-1296, 2009.

BRNE, P.; PODGORNIK, A.; BENCINA, K.; GABOR, B.; STRANCAR, A.; PETERKA, M. Fast and efficient separation of immunoglobulin M from immunoglobulin G using short monolithic columns. **J. Chromatogr. A**, v. 1144, n. 1, p. 120-125, 2007.

BURNOUF T. **Plasma proteins: Unique biopharmaceuticals - unique economics**. Pharmaceutical Policy & Law, v. 7, p. 209-218, 2005-2006.

BURNOUF, T. Modern plasma fractionation. **Transfus. Med. Rev.**, v. 21, p. 101-17, 2007.

CABRERA-CRESPO, J.; GONÇALVES, V. M.; MARTINS, E. A. L.; GRELLET, S.; LOPES, A. Y. & RAW, I. Albumin Purification from Human Placenta. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 31, p. 101-106, 2000.

CARVALHO, R. R. **Desenvolvimento de processos para purificação de Fator VIII de coagulação a partir de plasma humano**. 2008. 111f. Monografia (Aprimoramento em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, 2008.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHENG, E.; JINZENJI, D.; LORTHIOIS, A. P. A. A.; CARVALHO, R. R.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; RAW, I.; MARTINS, E. A. L. Purification of coagulation factor VIII using chromatographic methods. Direct chromatography of plasma in anion exchange resins. **Biotechnol. Lett.**, v. 32, p.1207-1214, 2010.

CHEUNG, R. C.; WONG, J. H.; Ng T. B. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 96, p. 1411-1420, 2012.

COHN E. J.; STRONG L. E.; HUGHES W. L.; MULFORDJ, D. J.; ASHWORTHM, N.; MELIN, M.; TAYLOR, H. I. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. **J. Am. Chemistry Soc.**, v. 68, p. 459-475, 1946.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006, 456 p.

EHRENSTEIN, M. R.; NOTLEY, C. A. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. **Nature**, v.10, p. 778-786, 2010.

EHRENSTEIN, M. R.; COOK, H. T.; NEUBERGER, M. S. Deficiency in serum immunoglobulin (Ig)M predisposes to development of IgG autoantibodies. **J. Exp. Med.**, v. 191, p. 1253-1258, 2000.

EJIN, D.; YUMIOKA, R.; ARAKAWA, T.; TSUMOTO, K. Arginine as an effective additive in gel permeation chromatography. **J. Chromatogr. A.**, v. 1094, p. 49-55, 2005.

ETTINGSHAUSEN C. E.; KREUZ W. Recombinant vs. plasmaderived products, especially those with intact VWF, regarding inhibitor development. **Haemophilia**, Suppl. 6, p. 102-106, 2006.

FARIA, A. M.; BOTTOLI, C. B. G.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. **Quim. Nova**, v. 29, p. 300-309, 2006.

FARRUGIA, A.; EVERS, T.; FALCOU, P. F.; BURNOUF, T.; AMORIM, L.; THOMAS, S. Plasma fractionation issues. **Biologicals**, v.37, p. 88-93, 2009.

FARRUGIA, A.; CASSAR, J. Plasma-derived medicines: access and usage issues. **Blood Transfus.**, v. 10, p. 273-278, 2012.

FARRUGIA, A.; PENROD, J.; BULT, J. M. Payment, compensation and replacement – the ethics and motivation of blood and plasma donation. **Vox Sang.**, v. 99, p. 202-211, 2010.

GAUTAM, S.; LOH, K. C. Immunoglobulin-M purification – challenges and perspectives. **Biotechnol. Adv.**, v. 29, p. 840-849, 2011.

GERMISHUIZEN, W. A.; GYURE, D. C.; STUBBINGS, D.; BURNOUF, T. Quantifying the thrombogenic potential of human plasma-derived immunoglobulin products. **Biologicals**, v. 42, p. 260-270, 2014.

GONÇALVES, V. M.; LEITE, L. C. C.; RAW, I.; CABRERA-CRESPO, J. Purification of catalase from human placenta. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 29, Pt 1, p. 73-7, 1999.

GRELLET S.; MARTINS, E. A. L.; GONÇALVES, V. M.; LOPES, A. P. Y.; RAW, I.; CABRERA-CRESPO, J. An associated process for the purification of immunoglobulin G, catalase, superoxide dismutase and albumin from haemolysed human placenta blood. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 34, p. 135-142, 2001.

GRIBBLE, J.; GARVEY, M. B. Porcine factor VIII provides clinical benefit to patients with high levels of inhibitors to human and porcine factor VIII. **Haemophilia**, v.6, n. 5, p. 482-485, 2000.

GITSCHIER J.; WOOD W. I.; GORALKA T. M.; WION, K. L.; CHEN, E. Y.; EATON, D. H.; VEHAR, G. A.; CAPON, D. J.; LAWN, R. M. Characterization of the human factor VIII gene. **Nature**, v. 312, p. 326-330, 1984.

IWASHITA, C. **Novas estratégias de purificação dos fatores de coagulação Fator VIII e Proteína C a partir de plasma humano empregando cromatografia líquida**. 2012. 143 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

JACOBIN, M.J., SANTARELLI, X., LAROCHE-TRAINEAU, J., CLOFENT-SANCHEZ G. Production of a human monoclonal IgM directed against human cardiac myosin in a hollow-fiber bioreactor for membrane anion exchange chromatography one-step purification. **Hum. Antibodies**, v.13, p.69-79, 2004.

JEHANLI, A.; HOUGH, D. A rapid procedure for the isolation of human IgM myeloma proteins. **J. Immunol. Methods**, v. 44, p. 199-204, 1981.

JINZENJI, D. **Desenvolvimento de processo cromatográfico para purificação de fator VIII humano. Emprego da anticorpos contra fragmentos específicos da proteína na avaliação da pureza e estabilidade durante as etapas de purificação**. 2008. 194 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

JOHNSON Jr, R. B.; LIBBY, R. Separation of immunoglobulin M (IgM) essentially free of IgG from serum for use in systems requiring assay of IgM-type antibodies without interference from rheumatoid factor. **J. Clin. Microbiol.**, v. 12, p. 451-454, 1980.

KAVERI, S. V.; SILVERMAN, G. J.; BAYRY, G. J. Natural IgM in immune equilibrium and harnessing their therapeutic potential. **J. Immunol.**, v. 188, p.939-945, 2012.

KHEDDO, P.; TRACKA, M.; ARMER, J.; DEARMAN, R. J.; UDDIN, S.; VAN DER WALLE, C. F.; GOLOOVANOV, A. P. The effect of arginine glutamate on the stability of monoclonal antibodies in solution. **Int. J. Pharm.**, v. 473, p. 126-133, 2014.

KLIMOVICH, V. B. IgM and its receptors: structural and functional aspects. **Biochemistry (Mosc)**, v. 76, p. 534-549, 2011.

LORTHIOIS, A. P. A. A. **Estudo para purificação de fator VIII humano e suíno. Ensaio de sensibilidade a tratamentos antivirais.** 2002. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MARTIN, N. H. The immunoglobulins: A review. **J. clin. Path.**, v. 22, p. 117-131, 1969.

MARTINS, S.; KARMALI, A.; ANDRADE, J.; SERRALHEIRO, M. L. Immobilized metal affinity chromatography of monoclonal immunoglobulin M against mutant amidase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Mol. Biotechnol.**, v. 33, p. 103-114, 2006a.

MARTINS, S.; ANDRADE, J.; KARMALI, A.; SERRALHEIRO, M. L. Screening of suitable immobilized metal chelates for adsorption of monoclonal antibodies against mutant amidase from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Mol. Recognit.**, v. 19, p. 340-347, 2006b.

MARTINS, S.; KARMALI, A.; SERRALHEIRO, M. L. Chromatographic behaviour of monoclonal antibodies against wild-type amidase from *Pseudomonas aeruginosa* on immobilized metal chelates. **Biomed. Chromatogr.**, v. 25, p. 1327-1337, 2011.

MÜLLER, R.; GRÄWERT, M. A.; KERN, T.; MADL, T.; PESCHEK, J.; SATTLER, M.; GROLL, M.; BUCHNER, J. High-resolution structures of the IgM Fc domains reveal principles of its hexamer formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 110, p. 10183-10188, 2013.

NAKAO, V. W.; VERINAUD, C. I.; FELICIANO, G. P.; LUIZ, A. C.; RAW, I.; MARTINS, E. A. L.; CHENG, E. Purification of prothrombin complex proteins from human plasma in anion exchange resin using pseudoaffinity chromatography. **BMC Proceedings**, v. 8, p. 23, 2014.

NEZLIN, R. Interaction between immunoglobulin G molecules. **Immunol. Lett.**, v. 122, p. 141-144, 2009.

NIKOLAYENKO, I. V.; GALKIN, O. Yu.; GRABCHENKO, N. I.; SPIVAK, M. Ya. Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis. **Ukrainica Bioorganica Acta** 2, p. 3-11, 2005.

NORRBY-TEGLUND, A.; HAQUE, K.N.; HAMMARSTRÖM, L. Intravenous polyclonal IgM-enriched immunoglobulin therapy in sepsis: a review of clinical efficacy in relation to microbiological aetiology and severity of sepsis. **J. Intern. Med.**, v.260, p. 509-516, 2006.

OFOSU, F. A.; FREEDMAN, J.; SEMPLE, J. W. Plasma-derives biological medicines used to promote Haemostasis. **Thromb. Haemost.**, v. 99, p. 851–862, 2008.

PATTISON, J. R.; MACE, J. E. Ellution patterns of rubella IgM, IgA, and IgG antibodies from a dextran and an agarose gel. **J. clin. Path.**, v. 28, p. 670-673, 1975.

PEROSA, F.; CARBONE, R.; FERRONE, S.; DAMMASCO, F. Purification of human immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and ammonium sulphate. **J. Immunol. Methods**, v. 128, p. 9-16, 1990.

PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Rio de Janeiro: Manole, 2005, p. 166-211.

PINTO, J. V. **Avaliação da presença de Fator XI de coagulação em preparações de imunoglobulina G para uso intravenoso**. 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

POOL J. G.; SHANNON A. E. Production of high-potency concentrates of antihemophilic globulin in a closed-bag system. **N. Engl. J. Med.**, v. 273, p. 1443-1447, 1965.

RADOSEVICH, M.; BURNOUF, T. Intravenous immunoglobulin G: trends in production methods, quality control and quality assurance. **Vox Sang.**, v. 98, p. 12-28, 2010.

RODRIGUEZ, E. S.; VERINAUD, C. I.; OLIVEIRA, D. S., RAW, I., LOPES, A. P., MARTINS, E. A. L., CHENG, E. Purification of coagulation fator VIII by immobilized metal affinity chromatography. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 62, p.343-348, 2015.

SAMPSON, I. A.; HODGEN, A. N.; ARTHUR, I. H. The separation of immunoglobulin M from human serum by fast protein liquid chromatography. **J. Immunol. Methods**, v. 69, p. 9-15, 1984.

SCHALLER, J.; GERBER, S.; KÄMPFER, U.; LEJON, S.; TRACHSEL, C. **Human blood plasma proteins: structure and function**. ed. John Wiley & Sons, 2008, p. 526.

SCHROEDER, H. W. Jr; CAVACINI, L. Structure of immunoglobulins. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 125, s 41-52, 2010.

SOARES, B. M. **Política de Hemoderivados no Brasil: Desafios e Perspectivas**. 101f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável) – Centro de Desenvolvimento Sustentável, Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

SROUR, M., KASSAB, I., MATTA, H., ELKAK, A. Histidine based adsorbents for selective removal of monoclonal immunoglobulin IgM antibodies from Waldenstrom's macroglobulinemia patient sera: A preliminary study. **J. Chromatogr. B.**, v. 932, p. 1-5, 2013.

TANAKA, K.; SAWATANI, E.; DIAS, G. A.; SHIGUEOKA, E. M.; CAMPOS, T. C. X. B.; NAKAO, H. C.; ARASHIRO, F. High quality human immunoglobulin G purified from Cohn fractions by liquid chromatography. **Bras. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 27-30, 2000.

TANAKA, A. M.; TANAKA, A. S.; LOPES, A. P. Y.; TAKAGI, M.; CABRERA-CRESPO, J., RAW, I. Purification of porcine plasma Factor FVIII using chromatographic methods. **Biotechnol. Lett.**, v. 22, p.257-260, 2000.

TATUM, A. H. Large scale recovery of biologically active IgM (95% pure) from human plasma obtained by therapeutic plasmapheresis. **J. Immunol. Methods**, v. 158, p. 1-4, 1993.

VARGAS, M.; SEGURA, A.; HERRERA, M.; VILLALTA, M.; ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; LEÓN, G.; BURNOUF, T. Purification of IgG and albumin from human plasma by aqueous two phase system fractionation. **Biotechnol Prog.**, v.28, p.1005-1011, 2012.

VARGAS, M.; SEGURA, Á.; WU, Y.W.; HERRERA, M.; CHOU, M.L.; VILLATA, M.; LEÓN, G.; BURNOUF, T. Human plasma-derived immunoglobulin G fractionated by an aqueous two-phase system, caprylic acid precipitation, and membrane chromatography has a high purity level and is free of detectable in vitro thrombogenic activity. **Vox. Sang.**, v.108, p. 169-177, 2015.

VIDAL, M. A.; CONDE, F. P. Human immunoglobulin M purification by affinity chromatography on protein A-Sepharose. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 4, p. 155-161, 1981.

WHITE, G. C. II; MCMILLAN, C. W.; KINGDON, H. S.; SHOEMAKER, C.B. Use of recombinant antihemophilic factor in the treatment of two patients with classic hemophilia. **N Engl J Med**, v. 320, p. 166-170, 1989.

World Health Organization. Global blood safety and availability. Facts and figures from the 2007 Blood Safety Survey, 2009. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs279/en/print.html>.

WU, Y. W.; CHAMPAGNE, J.; TOUEILLE, M.; GANTIER, R.; BURNOUF, T. Dedicated removal of immunoglobulin (Ig)a, IgM, and Factor (F) XI/activated FXI from human plasma IgG. **Transfusion**, v. 54, p.169-178, 2014.