

**Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo**  
**Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP**  
**“Dr. Antônio Guilherme de Souza”**  
**Instituto Butantan**

**Andressa Assunção dos Santos**

**Purificação da imunoglobulina M a partir da utilização de frações do  
plasma humano empregando técnicas de cromatografia líquida**

**São Paulo**  
**2022**

**Andressa Assunção dos Santos**

**Purificação da imunoglobulina M a partir da utilização de frações do plasma humano empregando técnicas de cromatografia líquida**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Vacinas e Biofármacos de Interesse em Saúde.

Orientadora: Elisabeth Cheng

**São Paulo**

**2022**

**Catlogação na Publicação  
Instituto Butantan  
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Santos, Andressa Assunção

Purificação da imunoglobulina M a partir da utilização de frações do plasma humano empregando técnicas de cromatografia líquida / Andressa Assunção Santos ; orientador(a) Elisabeth Cheng - São Paulo, 2022.

86 p. : il.

Monografia (Especialização) da Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP "Doutor Guilherme de Souza" - Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. IgM 2. Imunoglobulinas Humanas. 3. Purificação. 4. Cromatografia Líquida I. Cheng, Elisabeth. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe da Biblioteca do Instituto Butantan

Esta monografia foi elaborada com base no **Guia prático para elaboração de trabalho acadêmico** desenvolvido pela Biblioteca do Instituto Butantan, de acordo com as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

## AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Andressa Assunção dos Santos, aluno(a) do Vacinas e Biofármacos de Interesse em Saúde, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato  
 06 meses  
 12 meses  
 Outro prazo \_\_\_\_\_ Justifique:

São Paulo, 15 de fevereiro de 2022

Andressa A. dos Santos  
aluno(a)

De acordo: Elisam De  
Orientador(a):

A minha mãe, que me ensinou que eu deveria sempre correr atrás dos meus sonhos e que me apoiou em todos os momentos durante a minha formação. Obrigada!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao universo pela experiência de receber, aprimorar e compartilhar conhecimentos durante um ano em uma instituição tão renomada como o Instituto Butantan.

Agradeço a **minha família e amigos** que apoiaram minha decisão do início ao fim, permanecendo ao meu lado quando eu mais precisava.

Agradeço **Dra. Maria da Graça Salomão** por todos os esclarecimentos perante as dúvidas que surgiam durante a trajetória na especialização, e a todos os Doutores, Mestres, Pós-graduandos e demais envolvidos nas aulas teóricas. Tenho certeza que os conteúdos apresentados contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional como um todo.

À minha orientadora, **Dra. Elisabeth Cheng**, que teve paciência, cuidado, confiança e principalmente dedicação ao transmitir tanto conhecimento. Serei eternamente grata.

Agradeço a todos os amigos adquiridos durante a especialização, em especial à **Priscila**, que teve todo o cuidado e paciência durante seus ensinamentos e auxílio no desenvolvimento do projeto, e a **Isabela**, que contribuiu diretamente durante os aprendizados e procedimentos que executamos em nossos respectivos projetos.

E por fim, agradeço a **todos os colaboradores do Laboratório de Desenvolvimento de Processos**, que contribuíram direta ou indiretamente no desenvolvimento do meu projeto. Sei que sem a receptividade, carinho e amizade de cada um de vocês, meu trajeto não seria tão feliz e produtivo como foi.

“Quando o homem compreende a sua realidade, pode levantar hipóteses sobre o desafio dessa realidade e procurar soluções. Assim, pode transformá-la e o seu trabalho pode criar um mundo próprio, seu Eu e as suas circunstâncias.”

Paulo Freire

## RESUMO

SANTOS, Andressa Assunção. **Purificação da imunoglobulina M a partir da utilização de frações do plasma humano empregando técnicas de cromatografia líquida.** 2022. 86p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Vacinas e Biofármacos de Interesse em Saúde) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

A imunoglobulina M é um pentâmero de aproximadamente 950kDa, sendo composto por duas cadeias pesadas de 75kDa cada, duas cadeias leves de 25kDa e uma cadeia J de 15kDa. IgM é um candidato terapêutico promissor devido ao aumento de evidências que sugerem seu potencial de marcador tumoral, atividades anti-inflamatória e imunomoduladoras. Com o intuito de que todo seu potencial seja explorado, é importante que grandes quantidades de IgM estejam disponíveis a baixo custo. Nesse trabalho foram exploradas duas etapas de purificação que já estavam sendo desenvolvida pelo laboratório. Aplicou-se cromatografia de afinidade ao metal (IMAC) na fração 350mM proveniente da ANX Sepharose FF, com o intuito de obter IgM com alto grau de pureza. Foi observado que a melhor faixa de trabalho foi em pH 6,0 utilizando como metal imobilizado o cobalto e solução contendo NaCl 250mM. Como segunda estratégia, aplicou-se cromatografia de troca catiônica na fração 350mM diluído 10 vezes com água purificada e ao contrário da IMAC, não obtivemos resultados satisfatórios em relação a pureza de IgM. Apesar dos resultados alcançados, ainda é necessário o desenvolvimento de novas estratégias e estudos para o aumento de IgM, a fim de se obter uma imunoglobulina mais pura para possível uso terapêutico.

**Palavras-chave:** IgM. Imunoglobulinas. Purificação. Cromatografia líquida.



## ABSTRACT

SANTOS, Andressa Assunção. **Immunoglobulin purification using human plasma fractions employing liquid chromatography techniques**. 2022. 86p. Monograph (Specialization) – Human Resources Training Center for SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

Immunoglobulin M (IgM) is a pentamer of approximately 950kDa, consisting of two heavy chains of 75kDa each, two light chains of 25kDa and a J chain of 15kDa. IgM is a promising therapeutic candidate due to increasing evidence suggesting its potential as a tumor marker, anti-inflammatory and immunomodulatory activities. In order to exploit its full potential, it is important that large amounts of IgM are available at low cost. In this work, two purification steps that were already being developed by the laboratory were explored. Purification by metal affinity chromatography (IMAC) and cation exchange of the pool from plasma purification on Sepharose 4FF followed by ANX Sepharose FF was evaluated. In IMAC, the purification was evaluated at pHs 5.0, 6.0 and 7.0 and the results indicate that with pH 6.0 in IMAC-Co<sup>2+</sup> we obtained IgM with better recovery and greater purity. By varying the NaCl concentration in the equilibrium buffer between 250mM and 500mM, we found that IgM was obtained with greater purity in the purification in which 250mM NaCl was used in the equilibrium buffer. Using the cation exchange column, the results obtained were not satisfactory. The purity of IgM, calculated by the ImageJ program, was approximately 75%. To increase the purity of IgM, purification on the Superdex 200 gel filtration column will be evaluated.

**Keywords:** IgM. Immunoglobulin. Purification. Chromatography, Liquid.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Principais hemoderivados obtidos do fracionamento do plasma humano. ....	19
Figura 2 – Frequência de coletas de sangue no Brasil por tipo de prestador de serviço entre os anos 2014-2016. ....	22
Figura 3 – Separação progressiva de moléculas de diferentes tamanhos moleculares em cromatografia de gel filtração. ....	25
Figura 4 – Cromatografia de troca catiônica.....	26
Figura 5 – Estrutura básica de uma imunoglobulina G.....	30
Figura 6 – Diagrama de um pentâmero (à esquerda) e hexâmetro (à direita) de anticorpo de imunoglobulina M (IgM). As regiões constantes são mostradas em cinza, as regiões variáveis em verde e a cadeia J em vermelho.....	31
Figura 7 – Fluxograma da estratégia de purificação do IgM. Em negrito estão os experimentos realizados e as frações utilizadas. ....	35
Figura 8 – Determinação da eficiência do empacotamento. ....	36
Figura 9 – Teste de eficiência do empacotamento utilizando acetona a 1% em coluna XK16 empacotada com ANX Sepharose FF. ....	47
Figura 10 – Cromatograma da concentração em ANX Sepharose-FF em pH 6,0, utilizando o FT-1 da purificação em IMAC-Co <sup>2+</sup> pH 6,0 contendo NaCl 250mM. ....	48
Figura 11 – Análise do gel de poliacrilamida 10% com amostras redutoras advindas da ANX-Sepharose FF. ....	49
Figura 12 – Cromatograma da purificação em IMAC-Co <sup>2+</sup> em pH 8,0. FT1, FT2 e Reequilíbrio estão apresentados de forma amplificada.....	50
Figura 13 – Cromatograma da purificação em IMAC-Co <sup>2+</sup> em pH 7,0. FT1, FT2 e Reequilíbrio estão apresentados de forma amplificada.....	50
Figura 14 – Cromatograma da purificação em IMAC-Co <sup>2+</sup> em pH 6,0. FT1 e FT2 estão apresentados de forma amplificada.....	51
Figura 15 – Cromatograma da purificação em IMAC-Co <sup>2+</sup> em pH 5,0. ....	51
Figura 16 – Análise em gel de poliacrilamida a 10%, em condições redutoras das purificações em IMAC-Co <sup>2+</sup> .....	54
Figura 17 – Western Blot para a detecção de IgA, IgG e IgM, respectivamente, das frações coletadas na purificação IMAC Co <sup>2+</sup> pH 7,0. ....	56

Figura 18 – Western Blot para a detecção de IgA, IgG e IgM, respectivamente, das frações coletadas na purificação IMAC Co <sup>2+</sup> pH 6,0. ....	56
Figura 19 – Western Blot para a detecção de IgA, IgG e IgM, respectivamente, das frações coletadas na purificação IMAC Co <sup>2+</sup> pH 5,0. ....	57
Figura 20 – Cromatograma da purificação em IMAC-Zn <sup>2+</sup> em pH 7,0. FT-1, FT2 e FT3 estão apresentados de forma amplificada. ....	58
Figura 21 – Cromatograma da purificação em IMAC-Zn <sup>2+</sup> em pH 6,0. FT-1 e FT2 estão apresentados de forma amplificada.....	58
Figura 22 – Análise em gel de poliacrilamida a 10%, em condições redutoras das purificações em IMAC-Zn <sup>2+</sup> . ....	60
Figura 23 – Western Blot para a detecção de IgA, IgG e IgM, respectivamente, das frações coletadas na purificação IMAC Zn <sup>2+</sup> pH 7,0.....	61
Figura 24 – Western Blot para a detecção de IgA, IgG e IgM, respectivamente, das frações coletadas na purificação IMAC Zn <sup>2+</sup> pH 6,0.....	61
Figura 25 – Cromatograma da purificação em IMAC-Co <sup>2+</sup> em pH 6,0, com tampão de equilíbrio contendo NaCl 400mM. FT-1 e FT2 estão apresentados de forma amplificada. ....	62
Figura 26 – Cromatograma da purificação em IMAC-Co <sup>2+</sup> em pH 6,0, com tampão de equilíbrio contendo NaCl 350mM. FT-1, FT1b e FT2 estão apresentados de forma amplificada. ....	63
Figura 27 – Cromatograma da purificação em IMAC-Co <sup>2+</sup> em pH 6,0, com tampão de equilíbrio contendo NaCl 320mM. FT-1, FT1b e FT2 estão apresentados de forma amplificada. ....	63
Figura 28 – Cromatograma da purificação em IMAC-Co <sup>2+</sup> em pH 6,0, com tampão de equilíbrio contendo NaCl 300mM. FT-1, FT1b e FT2 estão apresentados de forma amplificada. ....	64
Figura 29 – Cromatograma da purificação em IMAC-Co <sup>2+</sup> em pH 6,0, com tampão de equilíbrio contendo NaCl 250mM. FT-1, FT1b e FT2 estão apresentados de forma amplificada. ....	64
Figura 30 – Análise em gel de poliacrilamida a 10%, em condições redutoras das purificações em IMAC-Co <sup>2+</sup> pH 6,0 com diferentes concentrações de NaCl.....	67
Figura 31 – Análise dos géis de poliacrilamida com gradiente 4-20% redutor e não redutor da purificação da IMAC-Co <sup>2+</sup> contendo NaCl 250mM.....	68

Figura 32 – Análise dos géis de poliacrilamida 10% com amostras redutoras e não redutoras advindas da purificação IMAC-Co <sup>2+</sup> contendo NaCl 250mM. ....	69
Figura 33 – Análise dos géis de poliacrilamida 7,5% com amostras não redutoras advindas da purificação IMAC-Co <sup>2+</sup> contendo NaCl 250mM. ....	70
Figura 34 – Análise do ImageJ do FT-1 em condições redutoras advindo da purificação IMAC-Co <sup>2+</sup> contendo NaCl 250mM, em gel gradiente 4-20%. ....	71
Figura 35 – Método de Bradford em microplaca com amostras da purificação de troca catiônica. ....	72
Figura 36 – Análise em gel de poliacrilamida a 10%, em condições redutoras da primeira purificação em HiTrap-SP. ....	73
Figura 37 – Método de Bradford em microplaca com amostras do segundo experimento em HiTrap-SP. ....	73
Figura 38 – Análise em gel de poliacrilamida a 10%, em condições redutoras do segundo experimento em HiTrap-SP. ....	75
Figura 39 – Teste de eficiência do empacotamento utilizando acetona a 1% em coluna XK16 empacotada com Superdex 200. ....	76
Figura 40 – Cromatograma da purificação em Superdex 200, utilizando a fração 500 da concentração em ANX Sepharose FF. ....	77
Figura 41 – Análise do gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações A47 a A53 da purificação em Superdex 200. ....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem dos principais hemoderivados produzidos a nível mundial. ....	21
Tabela 2 – Resinas utilizadas para filtração em gel. ....	24
Tabela 3 – Resinas utilizadas em cromatografia de troca iônica e suas características de trabalho. ....	27
Tabela 4 – Relação entre os íons metálicos mais utilizados na IMAC e suas interações.....	28
Tabela 5 – Características principais das imunoglobulinas. ....	29
Tabela 6 – Concentração de NaCl e condutividade das soluções de equilíbrio utilizadas nas purificações em IMAC-Co <sup>2+</sup> em pH 6,0. ....	38
Tabela 7 – Concentração do padrão BSA utilizado para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford e suas respectivas diluições. ....	40
Tabela 8 – Concentração do padrão BSA utilizado para a quantificação de proteínas pelo microensaio do método de Bradford e suas respectivas diluições. ....	41
Tabela 9 – Quantidade de reagente e amostra utilizados para a dosagem de imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM) por imunoturbidimetria. ....	42
Tabela 10 – Reagentes utilizados para o preparo de um gel SDS-PAGE.....	43
Tabela 11 – Proteínas totais obtidas pelo método de Bradford para as frações das purificações em IMAC Co <sup>2+</sup> em pHs 8,0, 7,0, 6,0 e 5,0, respectivamente, e a porcentagem de recuperação dessas proteínas em relação à amostra de entrada (350). ....	52
Tabela 12 – Concentração de IgM e IgM totais obtidos em imunoturbidimetria para as frações das purificações em IMAC Co <sup>2+</sup> em pHs 8,0, 7,0, 6,0 e 5,0, e a porcentagem de recuperação dessas proteínas em relação à amostra de entrada (350). ....	53
Tabela 13 – Proteínas totais obtidas pelo método de Bradford para as frações das purificações em IMAC Zn <sup>2+</sup> em pHs 7,0 e 6,0 e a porcentagem de recuperação dessas proteínas em relação à amostra de entrada (350). ....	59

Tabela 14 – Concentração de IgM e IgM totais obtidos em imunoturbidimetria para as frações das purificações em IMAC Zn <sup>2+</sup> em pHs 7,0 e 6,0, e a porcentagem de recuperação dessas proteínas em relação à amostra de entrada (350). .....	60
Tabela 15 – Proteínas totais obtidas pelo método de Bradford para as frações das purificações em IMAC Co <sup>2+</sup> contendo NaCl 300mM e 250mM no tampão de equilíbrio.....	65
Tabela 16 – Dosagem de IgM das frações das purificações em IMAC Co <sup>2+</sup> com tampões de equilíbrio contendo diferentes concentrações de NaCl.....	66
Tabela 17 – Concentração de IgA e IgA totais obtidos em imunoturbidimetria para as frações das purificações em IMAC Co <sup>2+</sup> em diferentes concentrações de NaCl.....	66
Tabela 18 – Porcentagem de IgM e IgA presentes no FT-1 em condições redutoras advindo da IMAC-Co <sup>2+</sup> contendo 250mM de NaCl em gel gradiente 4-20%, adquiras pelo ImageJ.....	71
Tabela 19 – Valores obtidos no método de Bradford em diferentes faixas de detecção após purificação em coluna de troca catiônica. ....	72
Tabela 20 – Valores obtidos no método de Bradford – microensaio na segunda purificação em coluna de troca catiônica HiTrap SP. ....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **Abs**: Absorbância
- **ANX**: Dietilaminopropil
- **APS**: Persulfato de amônio
- **BSA**: Albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*)
- **Da**: Daltons
- **FF**: Fast flow
- **FT**: Flow though
- **Ig**: Imunoglobulina
- **IGIV**: Imunoglobulina intravenosa
- **IMAC**: Cromatografia de Afinidade a Metal Imobilizado (*Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography*)
- **kDa**: quilodaltons (*kilodalton*)
- **mM**: mili molar
- **PAGE**: Eletroforese em gel de poliacrilamida (*polyacrylamide gel electrophoresis*)
- **PEG**: Polietilenoglicol
- **PFC**: Plasma fresco congelado
- **pI**: ponto isoelétrico
- **SDS**: Dodecil Sulfato de Sódio (*sodium dodecyl sulfate*)
- **TEMED**: N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
- **VC**: volume(s) de coluna

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>18</b>
<b>1.1</b>	<b>Hemoderivados</b>	<b>18</b>
1.1.1	Obtenção do plasma	21
<b>1.2</b>	<b>Purificação de proteínas por cromatografia líquida</b>	<b>22</b>
1.2.1	Cromatografia de exclusão molecular	23
1.2.2	Cromatografia de troca iônica	25
1.2.3	Cromatografia de afinidade ao metal	27
<b>1.3</b>	<b>Imunoglobulinas</b>	<b>28</b>
1.3.1	Imunoglobulina M	30
1.3.2	Purificação de imunoglobulinas	31
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>33</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral</b>	<b>33</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>Metodologia</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Empacotamento da ANX Sepharose FF</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Concentração de FT1 da purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> pH 6,0 em ANX Sepharose FF</b>	<b>37</b>
<b>3.3</b>	<b>Purificação do eluato da ANX Sepharose FF (fração 350) em IMAC</b>	<b>37</b>
<b>3.4</b>	<b>Purificação do eluato da ANX Sepharose FF (fração 350) em HiTrap-SP</b>	<b>38</b>
<b>3.5</b>	<b>Purificação do FT1 da IMAC-Co<sup>2+</sup> pH 6,0 em Superdex 200</b>	<b>39</b>
<b>3.6</b>	<b>Testes analíticos</b>	<b>40</b>
3.6.1	Quantificação de proteínas pelo método de Bradford	40
3.6.2	Quantificação de proteínas pelo método de Bradford – Microensaio	41
3.6.3	Dosagem de imunoglobulinas por imunoturbidimetria	41
3.6.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	42



3.6.5 Western Blot .....	44
<b>4 Resultados.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Empacotamento da ANX Sepharose FF.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 Concentração de FT1 da purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> pH 6,0 em ANX-Sepharose FF.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3 Purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> .....</b>	<b>49</b>
<b>4.4 Purificação em IMAC-Zn<sup>2+</sup> .....</b>	<b>57</b>
<b>4.5 Purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> utilizando diferentes concentrações de NaCl ...</b>	<b>62</b>
<b>4.6 Purificação do eluato da ANX Sepharose FF (fração 350) em HiTrap-SP ....</b>	<b>71</b>
<b>4.7 Purificação do FT1 da IMAC-Co<sup>2+</sup> pH 6,0 em Superdex 200 .....</b>	<b>75</b>
<b>5 Discussão .....</b>	<b>79</b>
<b>6 Conclusões.....</b>	<b>81</b>
<b>Referências .....</b>	<b>82</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Hemoderivados**

Os hemoderivados são produtos farmacêuticos biológicos que derivam do plasma, fração líquida do sangue. Sua importância no tratamento de doenças como as imunodeficiências primárias e secundárias, doenças hereditárias ou adquiridas, faz com que sejam considerados essenciais (BRASIL, 2019).

A albumina, imunoglobulinas e os concentrados de fatores de coagulação, entre os quais o fator VIII e IX, são considerados medicamentos essenciais para o sistema mundial de saúde segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS).

O plasma pode ser adquirido a partir do sangue total, ou a partir da plasmaférese. O plasma congelado em até 8 horas após a coleta é chamado de Plasma fresco congelado (PFC) e pode ser utilizado para a purificação de fatores de coagulação. O plasma simples, congelado em até 24 horas após a coleta, não pode ser utilizado para a purificação de fatores de coagulação devido à labilidade destas proteínas, mas pode ser utilizado para a purificação de proteínas mais estáveis como albumina e imunoglobulinas. A plasmaférese é procedimento onde o plasma é removido do organismo do doador através da utilização de uma máquina automatizada chamada separadora de células, onde o plasma é separado do sangue e as células retornam ao doador. Essa técnica é realizada apenas em centros específicos de doação de plasma, porém no Brasil, o plasma só pode ser obtido a partir da doação de sangue total (CGEE, 2006; COVAS, 2014; BRASIL, 2015). A figura 1 mostra um exemplo de um processo de fracionamento do plasma para obtenção de hemoderivados.



variedade de antígenos (CGEE, 2006; SILVA, 2010; AMORIN FILHO, 2013; FONSÊCA, 2014).

A história do Brasil na produção de hemoderivados teve início em 1961 com a cooperação Brasil-França em hemoterapia, com a tentativa de “compra” de dois bancos de sangue na França pelo Luiz Tavares da Silva, cirurgião pernambucano e professor universitário, para instalação no Rio de Janeiro e São Paulo, o que acabou não ocorrendo devido à renúncia do presidente Jânio Quadros. Em 1962, a França cedeu quatro bolsas de estudo para especialização em Hematologia e transfusão de sangue, garantindo uma capacitação técnico-científica (JUNQUEIRA; ROSENBLIT; HAMERSCHLAK, 2005).

O programa Brasil-França foi intensificado em 1977 com a inauguração do Hemocentro de Pernambuco (HEMOPE), concebido de acordo com o modelo dos centros hemoterápicos existentes na França, dirigido por Gonzaga dos Santos. Esse Hemocentro serviu como base para a criação do Programa Nacional de Sangue e Hemoderivados (Pró-Sangue) em 30 de abril de 1980 (JUNQUEIRA; ROSENBLIT; HAMERSCHLAK, 2005; CGEE, 2006). Em Teresópolis, no Rio de Janeiro, uma fábrica que pertencia à multinacional Hoechst foi instalada, sendo esta para a fabricação de albumina (CGEE, 2006).

Em meados de 1979, as doações eram realizadas por presidiários ou mendigos em troca de cigarros e remuneração, o que inconformava o então presidente da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, Celso Carlos de Campos Guerra, que culminou em junho de 1980, a extinção da doação de sangue remunerada no Brasil, utilizando como estratégia o chamado de doador de reposição, sendo estes amigos e familiares dos pacientes que eram sensibilizados e conscientizados para o ato de doar (JUNQUEIRA; ROSENBLIT; HAMERSCHLAK, 2005; CGEE, 2006).

No mundo, após a descoberta da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida na década de 1980, surgirão muitos casos de contaminação em hemofílicos pelo vírus HIV, levando esses indivíduos a óbito. Essa contaminação ocorreu devido às transfusões dos concentrados de fatores de coagulação VIII ou IX, obrigando as indústrias de hemoderivados a implantar métodos de inativação viral. O primeiro método aplicado foi o tratamento por calor, rapidamente seguido pelo tratamento com solvente-detergente, garantindo uma segurança maior aos hemoderivados (CGEE, 2006).

Durante o período de 2014 a 2016, o Brasil registrou uma média de 3.6 milhões de coletas de sangue tanto na rede pública quanto na privada (BRASIL, 2019), enquanto a nível mundial, a média é de 118,4 milhões de coleta de sangue, sendo que quarenta por cento desse valor é coletado em países de alta renda (WHO, 2020).

### 1.1.1 Obtenção do plasma

O plasma humano é um material biológico complexo, possuindo numerosas proteínas que se apresentam em concentrações diferentes e com funções fisiológicas distintas. Assim, o plasma é utilizado como um produto terapêutico, ou como matéria prima para produção de hemoderivados (BURNOUF, 1995; BURNOUF, 2007).

Pela sua escassez, é possível obter o plasma a partir de três fontes no mundo: a primeira é a partir do voluntariado, a segunda é o doador pago, e a terceira se encaixa como o doador que repõe o estoque do banco de sangue devido à utilização de componentes por algum familiar. Em países desenvolvidos, prevalecem os doadores pagos, porém este é um modelo proibido no Brasil (CGEE, 2006; FARRUGIA; PENROD; BULT, 2010).

Após a coleta, o sangue é submetido à centrifugação para a separação dos hemocomponentes do plasma. As proteínas provenientes do fracionamento do plasma são denominadas hemoderivados, sendo a imunoglobulina intravenosa (IGIV) um dos produtos mais utilizados atualmente a nível mundial, assim como fatores de coagulação VIII, IX, XI, FXIII, fibrinogênio, entre outros (BURNOUF, 2007). Na tabela 1 estão citados os principais hemoderivados que são produzidos a nível mundial.

**Tabela 1** – Porcentagem dos principais hemoderivados produzidos a nível mundial.

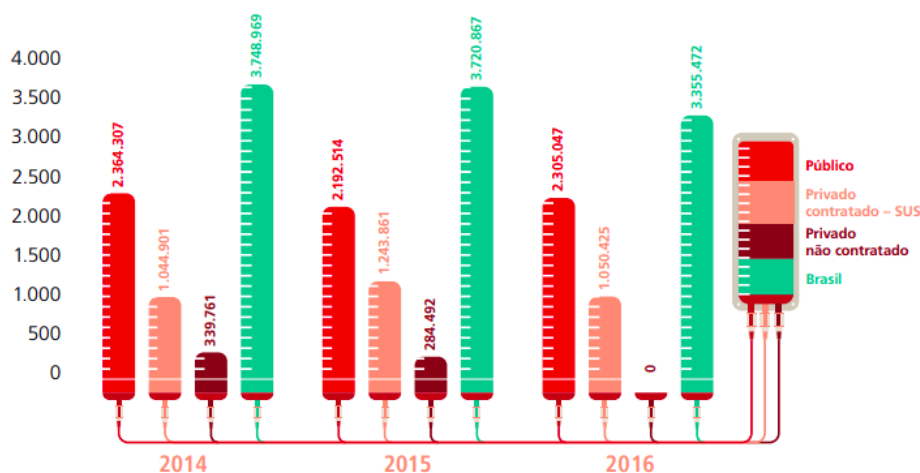
<b>Produto</b>	<b>Porcentagem</b>
<b>Imunoglobulinas</b>	36,6%
<b>Fator VIII Recombinante</b>	20,8%
<b>Albumina</b>	9,3%

<b>Fator VIII Plasma</b>	7,4%
<b>Fator VII Recombinante</b>	5,7%
<b>F IX Recombinante</b>	3,4%
<b>Alpha 1-Antitripsina</b>	2,7%
<b>CPP ativado (complexo protrombínico)</b>	2,6%
<b>FvW (Fator Von Willebrand)</b>	2,1%

Fonte: Adaptado de COVAS, 2014.

Na figura 2, observa-se o perfil de coletas de sangue no Brasil no período de 2014 a 2016, considerando os serviços que obtiveram as coletas, sendo eles públicos, serviços privados contratados pelo SUS ou serviços privados não contratados pelo SUS (BRASIL, 2018). Dados mais atualizados ainda não foram disponibilizados pelo Ministério da Saúde.

**Figura 2** – Frequência de coletas de sangue no Brasil por tipo de prestador de serviço entre os anos 2014-2016.



Fonte: Ministério da Saúde/SAS, Sistema de Informações Ambulatoriais do SUS (SIA/SUS) e Associação Brasileira de Bancos de Sangue (ABBS), 2016.

## 1.2 Purificação de proteínas por cromatografia líquida

O principal método para purificação de proteínas do plasma humano baseia-se no método de precipitação fracionada com etanol em baixas temperaturas e variação de pH desenvolvido por Cohn na década de 1940 (BURNOUF, 2007; OFOSU; FREEDMAN; SEMPLE, 2008). Apesar de ser um método simples e de baixa toxicidade, apresenta uma baixa especificidade na purificação de proteínas presente em baixas concentrações plasmáticas (BURNOUF, 2007).

Atualmente, os processos de produção de hemoderivados combinam a purificação por precipitação pelo método de Cohn com métodos cromatográficos devido à necessidade de se obter produtos cada vez mais puros (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; COSKUN, 2016).

A cromatografia se baseia em três componentes que interagem entre si para a separação de moléculas presentes em uma solução, sendo eles a fase estacionária, correspondente a fase “sólida”, a fase móvel, que corresponde a um componente líquido, e por último, as moléculas da amostra a serem separadas (COSKUN, 2006).

As características moleculares relacionadas à adsorção das moléculas, afinidade ou diferença de pesos moleculares, são responsáveis pela sua separação. Essas diferenças fazem com que algumas moléculas permaneçam mais tempo na fase estacionária, movendo-se lentamente no sistema, enquanto outras moléculas são carregadas rapidamente pela a fase móvel (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; COSKUN, 2016).

O objetivo da aplicação da cromatografia é obter uma separação satisfatória de moléculas, existindo diferentes métodos para alcançar esse objetivo. Dentre os diversos tipos, abordaremos a cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão molecular e a cromatografia de afinidade a metal, utilizadas neste projeto.

### 1.2.1 Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular, também conhecida como cromatografia por exclusão de tamanho, gel filtração ou cromatografia de peneira molecular, é um método utilizado para separação de macromoléculas a partir dos diferentes tamanhos moleculares (PESSOA; KILIKIAN, 2005; Ó'FÁGÁIN; CUMMINS; O'CONNOR, 2016). A fase estacionária consiste em resinas hidratadas semelhantes a esponjas, que possuem poros de dimensões moleculares e com uma faixa de

tamanhos (PRAPULLA; KARANTH, 2014). Na tabela 2, estão descritas algumas resinas usadas em gel filtração, consistindo em grânulos compostos de poliacrilamida reticulada, agarose, dextrano ou pela combinação destes.

**Tabela 2** – Resinas utilizadas para filtração em gel.

<b>Material</b>	<b>Faixa de fracionamento (proteínas globulares)</b>
<b>Dextran</b>	Sephadex G-10: 0–700 Da
	Sephadex G-25: 1000–5000 Da
	Sephadex G-50: 1500–30.000 Da
	Sephadex G-100: 4.000–150.000 Da
	Sephadex G-200: 5.000–600.000 Da
<b>Agarose</b>	Sepharose 6B: 10.000–4.000.000 Da
	Sepharose 4B: 60.000–20.000.000 Da
	Sepharose CL-4B: 60.000–20.000.000 Da
	Sepharose CL-2B: 70.000–40.000.000 Da
<b>Alil dextrano-bis-acrilamida</b>	Sephacryl S-200 HR: 5.000–250.000 Da
	Sephacryl S-300 HR: 10.000–1.500.000 Da
	Sephacryl S-400 HR: 20.000–8.000.000 Da
<b>Dextran + agarose</b>	Superdex 30 Increase: 100–7.000 Da
	Superdex 75 Increase: 3.000–70.000 Da
	Superdex 200 Increase: 10.000–600.000 Da
	Superdex 30 prep grade: < 10.000 Da
	Superdex 75 prep grade: 3.000–70.000 Da
	Superdex 200 prep grade: 3000–600.000 Da

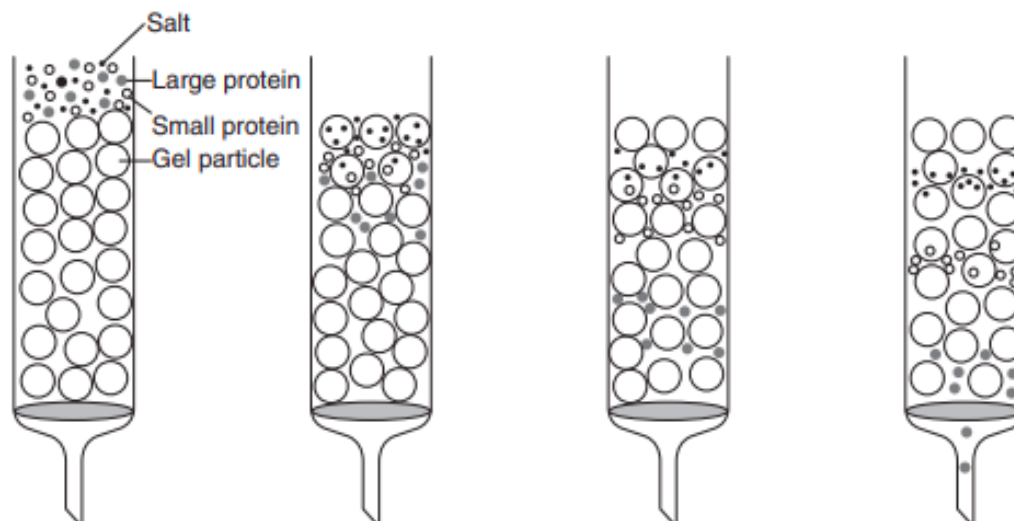
**Fonte:** Adaptado de GE Healthcare Lifesciences, 2021; Ó'FÁGÁIN; CUMMINS; O'CONNOR, 2016;

Na cromatografia de filtração em gel é recomendada a aplicação de 1 a 5% do volume de coluna. O processo de separação ocorre porque as moléculas de tamanho molecular menor entram nos poros da resina, enquanto as moléculas de tamanho maior não, deixando a coluna em tempo de retenção menor (PRAPULLA;



KARANTH, 2014; COSKUN, 2016; Ó'FÁGÁIN; CUMMINS; O'CONNOR, 2016). Esse processo pode ser observado na figura 3.

**Figura 3** – Separação progressiva de moléculas de diferentes tamanhos moleculares em cromatografia de gel filtração.



**Fonte:** PRAPULLA; KARANTH, 2014.

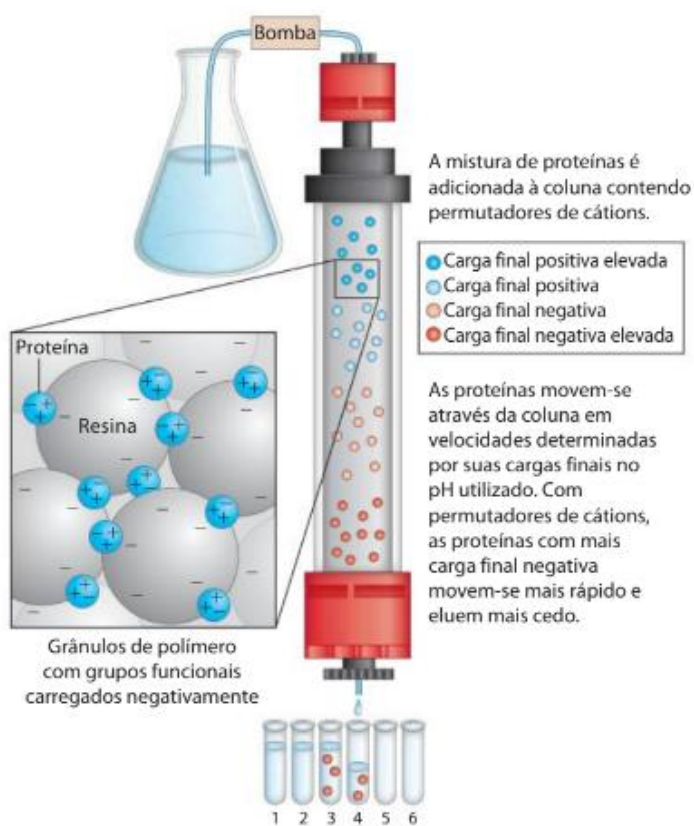
Nesse tipo de cromatografia, o fluxo é inversamente proporcional à resolução da separação, por isso, quanto menor o fluxo, maior será a separação das moléculas presentes na amostra, e maior será o tempo de purificação. Contudo, a gel filtração é um dos métodos mais populares de separação, pois garantem versatilidade e ampla variedade de matrizes, também chamadas de resinas, que podem ser utilizadas (Ó'FÁGÁIN; CUMMINS; O'CONNOR, 2016).

### 1.2.2 Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica é baseada na diferença de afinidade eletrostática dos íons de proteínas de interesse e contaminantes, pelos grupos carregados da matriz. A separação ocorre com alteração de pH, concentração de sais ou a partir da força iônica da solução tampão utilizada (KARLSSON; RYDEN; BREWER, 1998; COSKUN, 2016).

As matrizes ou resinas iônicas podem ser de dois tipos: resinas de troca catiônica e de troca aniônica. As resinas de troca catiônica são carregadas negativamente e adsorvem proteínas que estão carregadas positivamente. Estes podem ser ácidos fortes, intermediários ou fracos. Já as resinas de troca aniônica são carregadas positivamente e adsorvem proteínas carregadas negativamente. Esses ânions podem ser fortes, intermediários ou fracos (COSKUN, 2016; MASOODI; LONE; RASOOL, 2021). A purificação em troca catiônica pode ser observada na figura 4.

**Figura 4 –** Cromatografia de troca catiônica.



**Fonte:** NELSON; COX, 2014, p. 91.

Os termos forte e fraco se referem à extensão na qual o estado de ionização, ou seja, a perda ou ganho de elétrons dos grupos funcionais variam com a mudança de pH. Na tabela 3 estão apresentadas algumas informações sobre resinas de troca iônica usadas em nosso laboratório.

**Tabela 3** – Resinas utilizadas em cromatografia de troca iônica e suas características de trabalho.

	<b>Q Sepharose FF (Aniônica forte)</b>	<b>ANX Sepharose FF (Aniônica fraca)</b>	<b>HiTrap SP FF 1- 5mL (Catiônica forte)</b>	<b>HiTrap CM FF 1-5mL (Catiônica fraca)</b>
<b>Fluxo de trabalho recomendado</b>	50-400cm/h	50-300cm/h	> 1ml/min > 5ml/min	> 1ml/min > 5ml/min
<b>Fluxo máximo</b>	750cm/h	400cm/h	>4ml/min >20ml/min	>4ml/min >20ml/min
<b>Faixa de pH de trabalho</b>	2-12	3-10	4-13	6-10
<b>Contrapressão operacional max (MPa/psi)</b>	0.3/43	0.1-14	0.3/43	0.3/43

**Fonte:** Adaptado de GE Healthcare Lifesciences, 2021.

### 1.2.3 Cromatografia de afinidade ao metal

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, conhecida pela sigla IMAC, foi formulada em 1975 por Porath e colaboradores, baseando-se na afinidade conhecida de íons de metais como  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  e  $Ni^{2+}$  para histidina e cisteína em soluções aquosas, apresentado por Hearon em 1948, estendendo-se à ideia de utilizar estes íons com o intuito de fracionamento de soluções contendo biomoléculas (HEARON, 1948; PORATH *et al.*, 1975; BLOCK *et al.*, 2007).

Proteínas ou outras biomoléculas são adsorvidas pela formação de complexos com os íons metálicos, e sua eluição ocorre por competição com outras moléculas doadoras de elétrons, como por exemplo, o imidazol, ou por protonação de grupos doadores de elétrons presentes na proteína adsorvida, a partir da redução do pH (BRESOLIM; MIRANDA; BUENO, 2009). Os íons mais utilizados são  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  e  $Ni^{2+}$  (tabela 4).

**Tabela 4** – Relação entre os íons metálicos mais utilizados na IMAC e suas interações.

Íons metálicos	Interação	Utilização na IMAC
<b>Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup></b>	Interação com nitrogênio aromático dos grupamentos imidazol, indol e enxofre do grupamento tiol de cada aminoácido.	Purificações com proteínas que apresentam resíduos de histidina, triptofano e cisteína.
<b>Fe<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup></b>	Interação com fosfato e fosfoésteres primários.	Purificações de separação de fosfoproteínas.
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Coordenação estável do átomo de oxigênio presente em grupos carboxílicos de resíduos dos ácidos aspártico e glutâmico.	Purificações de proteínas ricas em grupamentos carboxílicos, como fibrinogênio.

**Fonte:** Adaptado de BRESOLIM; MIRANDA; BUENO, 2009;

### 1.3 Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são proteínas compostas por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias leves, apresentando massa molecular de aproximadamente 25kDa, e duas cadeias pesadas com massa molecular de 50 a 75kDa aproximadamente, ligadas por pontes dissulfeto. São divididas em cinco classes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, apresentando-se em monômeros (IgD, IgE e IgG), dímero (IgA) pentâmero ou hexâmero (IgM) (MARTIN, 1969; BRADLEY, 1974; SCHROEDER; CAVACINI, 2010).

A união entre imunoglobulinas IgA ou IgM é dada a partir da cadeia J, um polipeptídeo que apresenta entre 15 e 16kDa. É produzido por células B e é incorporado nessas imunoglobulinas poliméricas durante a via excretora do sistema imunológico. Para IgA é essencial para a polimerização e secreção. Para a IgM, é requerido na secreção em sua forma pentamérica, mas não sendo necessário em IgM hexaméricas (SCHROEDER; CAVACINI, 2010).

As características principais das imunoglobulinas estão apresentadas na tabela 5, como massa molecular, estrutura das subunidades, classe e faixa de concentração em g/L.

**Tabela 5 – Características principais das imunoglobulinas.**

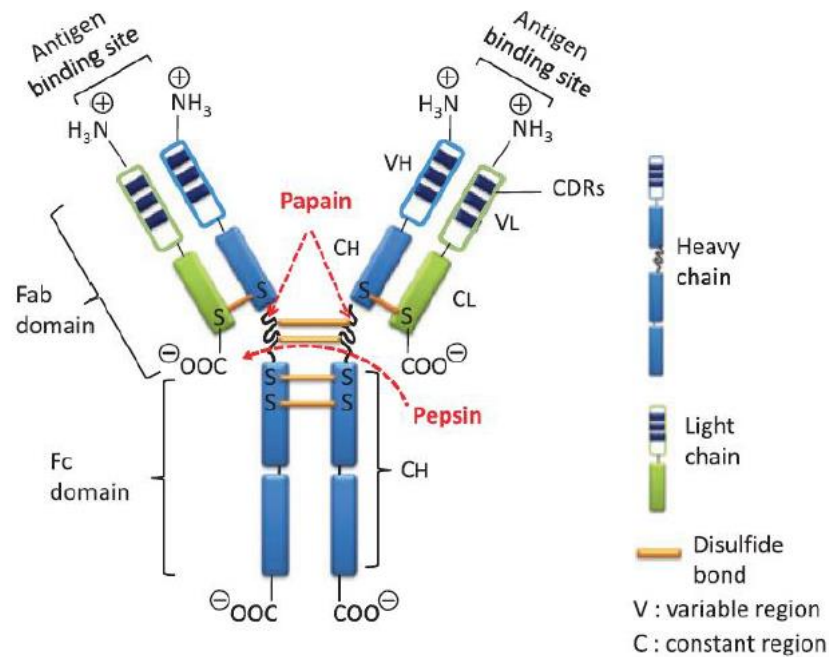
<b>Classe de imunoglobulina</b>	<b>Estrutura da subunidade</b>	<b>Massa molecular (kDa)</b>	<b>Faixa de concentração (g/L)</b>
<b>IgA</b>	$\alpha_2\kappa_2/\lambda_2$ ( $\alpha_2\kappa_2/\lambda_2$ ) <sub>n</sub> J (n=2-4)	150 390-690	0,5 – 3,5
<b>IgD</b>	$\delta_2\kappa_2/\lambda_2$	176	0,03
<b>IgE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

**Fonte:** Adaptado de SCHALLER, 2008.

IgG é a segunda proteína em maior concentração no sangue (7-14 mg/mL), sendo a proteína mais abundante a albumina (20mg/mL) (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), dados importantes para a seleção das técnicas cromatográficas que serão aplicadas para a melhor purificação dessas imunoglobulinas.

Na figura 5 está ilustrada a estrutura básica de uma imunoglobulina G, apontando as cadeias pesadas e leves, além das pontes dissulfeto entre elas e entre as duas cadeias pesadas.

**Figura 5 – Estrutura básica de uma imunoglobulina G.**



Fonte: RADOSEVICH; BURNOUF, 2010.

### 1.3.1 Imunoglobulina M

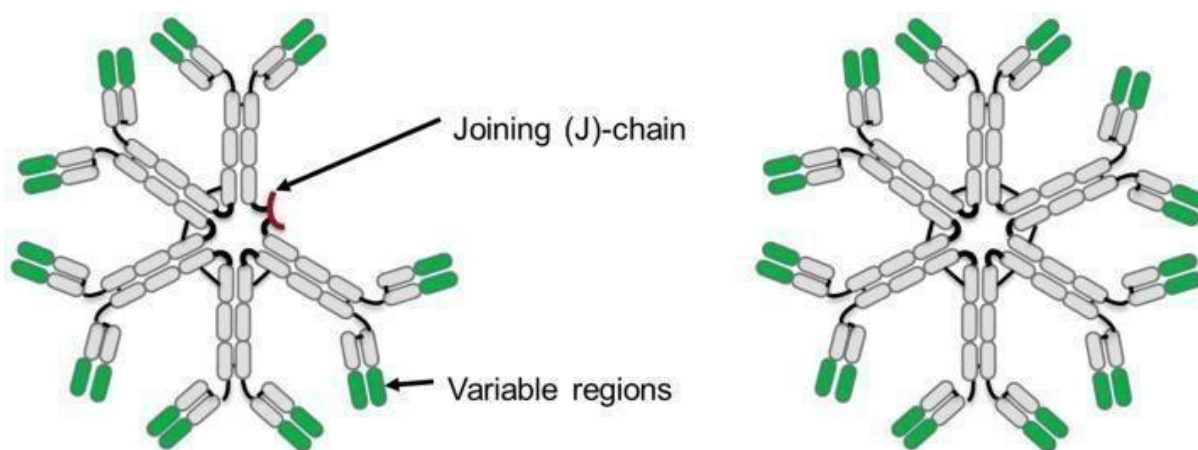
A primeira descrição de anticorpos IgM foi relatada por Kabat e colaboradores em 1939, que avaliou o peso molecular de anticorpos produzidos em cavalo, porco, vaca, macaco e soro humano após imunização com pneumococo. Devido ao grande tamanho (aproximadamente 990 kDa), o novo anticorpo foi referido como  $\gamma$ -macroglobulina. Em 1964, a Organização Mundial da Saúde definiu um sistema de nomenclatura para isótipos de anticorpos, e a  $\gamma$ -macroglobulina foi renomeada como IgM, sendo que o M se referiu a “macroglobulina” (CEPPELLINI, 1964; KEYT *et al.*, 2020).

O IgM é o primeiro anticorpo a ser produzido durante uma resposta imune e a aparecer durante a ontogênese. Também está ligado à superfície de células B ou presente no sangue na forma secretada (EHRENSTEIN; NOTLEY, 2010).

Inicialmente produzida como uma molécula ligada à superfície e expressa na diferenciação de células B, a macroimunoglobulina M é posteriormente produzida durante a resposta imune por células plasmáticas que a secretam como pentâmeros

solúveis contendo dez sítios de ligação ao antígeno e a cadeia de união (J), ou como hexâmeros, contendo doze sítios de ligação ao antígeno e nenhuma cadeia de união (J) (KEYT *et al.*, 2020), como ilustrado na figura 6.

**Figura 6** – Diagrama de um pentâmero (à esquerda) e hexâmetro (à direita) de anticorpo de imunoglobulina M (IgM). As regiões constantes são mostradas em cinza, as regiões variáveis em verde e a cadeia J em vermelho.



Fonte: KEYT *et al.*, 2020.

Segundo estudos, a redução da quantidade de IgM pode favorecer a predisposição à doenças autoimunes (EHRENSTEIN; NOTLEY, 2010). Com a sua natureza polivalente, os IgMs podem exibir maior avidéz por antígenos do que o IgG bivalente. Além de neutralizar patógenos, as imunoglobulinas da classe M são altamente eficazes no envolvimento do complemento para direcionar a lise de células e patógenos (KEYT *et al.*, 2020).

Desta forma, concentrados de IgM são valiosos na área terapêutica e científica, pois é possível utilizá-los no tratamento de infecções associado a sepse, assim como para rejeição de transplantes e doenças autoimunes (KAVERI, 2012). As relações de biologia, estrutura e função para anticorpos IgM progrediram ao ponto de este anticorpo poder ser explorado terapêuticamente, porém, os desafios associados à sua fabricação permanecem (KEYT *et al.*, 2020).

### 1.3.2 Purificação de imunoglobulinas

Para a utilização intravenosa de imunoglobulinas, estas necessitam seguir requisitos como baixa atividade anticomplementar e se apresentarem como uma molécula intacta. A imunoglobulina G intravenosa é apresentada de forma liofilizada, garantindo suas propriedades, conservação e facilidade no transporte (HÄSSIG, 1986; TANAKA *et al.*, 2000).

A imunoglobulina G é tradicionalmente purificada a partir da utilização de plasma humano reunido de milhares de doadores, de forma que a variedade de anticorpos presentes seja vasta (TANAKA *et al.*, 1998). Os principais processos empregados para a purificação de IgG são baseados no método de Cohn, utilizando etanol frio, ou com a utilização de cromatografia por troca iônica e exclusão molecular (COHN *et al.*, 1950; MIELKA; GOZZE, 1975).

Tanaka e seus colaboradores utilizaram as frações I+II+III de Cohn em seus experimentos, desenvolvendo um processo no qual a purificação foi realizada em duas colunas de troca iônica, utilizando Q-Sepharose FF e CM-Sepharose FF, e uma de gel filtração, usando a resina Sephacryl S-300 HR, tendo a separação de IgG e IgM devido à absorção de IgM e outras proteínas como o IgA na primeira coluna, enquanto IgG foi adsorvido na segunda coluna de troca iônica (Tanaka *et al.*, 2000).

Atualmente, a preparação de IgG é realizada a partir da fração II+III de Cohn, sendo submetidas a troca iônica, precipitação de PEG para remoção de contaminantes ou utilização de ácido caprílico, que é um método simples que apresenta boa pureza, rendimento e menor tempo de processamento, atuando também como um antiviral eficiente (BURNOUNF, 2007; MORAIS; BERASAIN; MASSALDI, 2014).

Vários trabalhos descritos na literatura utilizam a cromatografia por exclusão molecular, também denominada de gel filtração, como etapa principal ou como parte da metodologia para obtenção de IgM (PATTISON; MACE, 1975; PEROSA *et al.*, 1990; NIKOLAYENKO *et al.*, 2005).

Todos os métodos apresentam suas vantagens e desvantagens, e é necessário o estudo de diferentes estratégias para que seja possível encontrar a melhor, na qual seja possível alcançar o maior nível de pureza, com bom rendimento e com custos reduzidos.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

O objetivo geral foi a purificação de IgM a partir do plasma humano, empregando cromatografia líquida.

### **2.2 Específicos**

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Avaliar duas técnicas diferentes para purificação de IgM a partir do pool obtido após duas etapas cromatográficas, Sepharose 4 Fast Flow (FF) e ANX Sepharose FF, respectivamente: a) IMAC com diferentes metais, pHs e condutividades e b) cromatografia de troca catiônica empregando HiTrap- SP;
- Avaliar a purificação da fração FT1 da IMAC-Co<sup>2+</sup> pH 6,0, utilizando tampão de equilíbrio contendo NaCl 250mM, em coluna de gel filtração Superdex 200.

### 3 METODOLOGIA

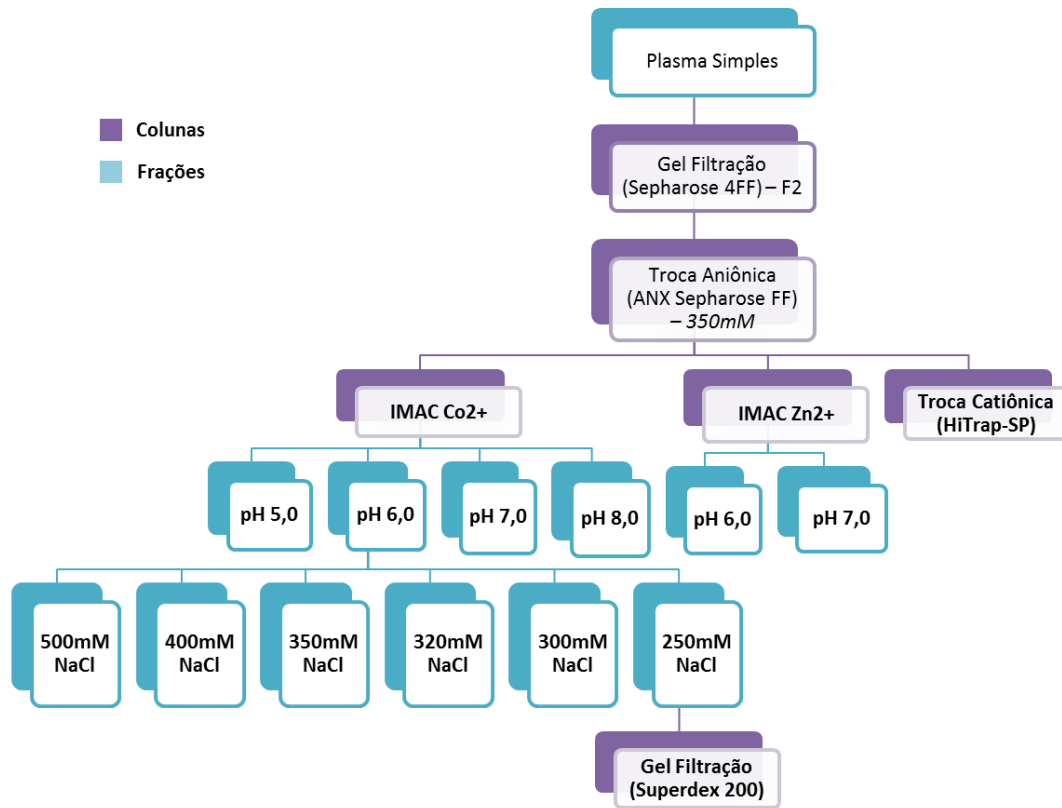
As amostras utilizadas neste projeto foram obtidas após da purificação do plasma em Sepharose 4FF (1VC = 1178mL) (Cytiva, EUA), seguida da troca aniônica ANX Sepharose FF (1VC = 50mL) (Cytiva, EUA). O plasma inicial utilizado foi o plasma fresco congelado gentilmente cedido pela Fundação Pró Sangue – Hemocentro de São Paulo. As bolsas mantidas em freezer -80°C foram descongeladas em banho-maria à 37°C e aplicadas diretamente em Sepharose 4FF.

Foram realizadas 3 purificações em Sepharose 4FF e o pool da fração 2 (F2) foi empregado como amostra de entrada da coluna ANX Sepharose FF. O pool da fração 350mM obtido a partir de 6 purificações em ANX Sepharose FF foi utilizado como amostra de entrada para os estudos empregando as colunas IMAC-Co<sup>2+</sup>, IMAC-Zn<sup>2+</sup> e HiTrap-SP. A amostra de entrada foi denominada “350”.

O cromatógrafo utilizado neste trabalho foi o NGC da BioRad controlado pelo programa ChromLab.

A figura 7 mostra o fluxograma das etapas cromatográficas deste trabalho.

**Figura 7** – Fluxograma da estratégia de purificação do IgM. Em **negrito** estão os experimentos realizados e as frações utilizadas.



Fonte: Próprio autor, 2021.

### 3.1 Empacotamento da ANX Sepharose FF

A coluna foi empacotada com o intuito de concentrar o FT1 advindo da IMAC-Co<sup>2+</sup> pH 6,0 com solução acetato 20mM contendo NaCl 250mM, para sua aplicação na coluna Superdex 200. O empacotamento foi realizado em uma coluna XK16/20 (Cytiva, EUA), com fluxo de 4mL/min. O volume da coluna foi de 3,21mL.

A eficiência do empacotamento foi verificada com a injeção de 1% do volume da coluna de acetona 1% (v/v), eluído por 1,5VC de água filtrada. A altura de um prato teórico (HEPT) e o número de pratos teóricos por metro de resina (N/m) foram calculados por meio das equações:

$$HEPT = L/N$$

Equação 1

Em que  $L$  é a altura da coluna e  $N$  é o número de pratos teóricos. O número de pratos teóricos foi calculado a partir da equação 2:

$$N = 5,54.(V_r/W_r)^2 \quad \text{Equação 2}$$

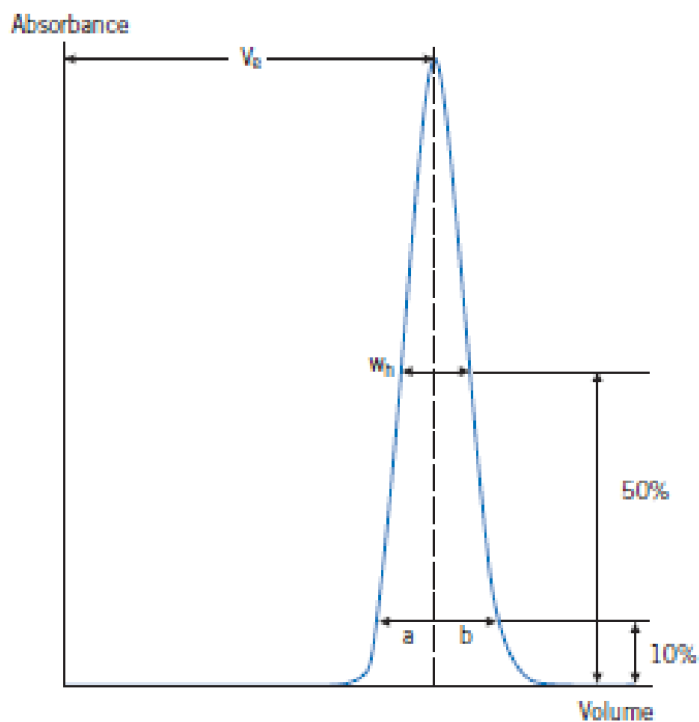
Em que  $V_r$  é o volume de eluição da amostra medido a partir da aplicação da amostra e  $W_r$  é largura do pico na metade da altura. Por fim, calculou-se o número de pratos teóricos por metro de resina ( $N/m$ ):

$$N/m = N/L \quad \text{Equação 3}$$

O fator de assimetria da coluna ( $A_s$ ) é calculado dividindo-se a largura da segunda metade do pico ( $b$ ) pela largura da primeira metade do pico ( $a$ ), ambos medidos a 10% da altura do pico, conforme Equação 4:

$$A_s = b/a \quad \text{Equação 4}$$

**Figura 8** – Determinação da eficiência do empacotamento.



### **3.2 Concentração de FT1 da purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> pH 6,0 em ANX Sepharose FF**

O FT-1 da purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> pH 6,0, com solução de equilíbrio contendo NaCl 250mM foi concentrada em ANX Sepharose FF a fim de ser aplicada na coluna Superdex 200, com o fluxo de 4mL/min.

Após o empacotamento foram preparadas as seguintes soluções para a concentração da amostra FT1: solução de equilíbrio (acetato 20mM contendo NaCl 120mM, pH 6,0) e Solução de eluição (acetato 20mM contendo NaCl 500mM, pH 6,0). A amostra FT1 foi diluída em água purificada, na proporção 1:1. As frações foram coletadas de 1,5 em 1,5mL durante a aplicação da amostra e do reequilíbrio e de 0,5 em 0,5mL durante a eluição, e reunidas de acordo com a formação dos picos apresentados no cromatograma.

Para a limpeza da coluna, foram utilizados 2VC de NaCl 2M, 4VC de NaOH 1M, 2VC de NaCl 2M, 2VC de água purificada, 5VC de tampão de equilíbrio para abaixar o pH, e por último, 4VC de etanol 20% para armazenamento. Todas as soluções preparadas foram filtradas em Stericup 0,22µm GV PVDF (Millipore, Estados Unidos).

### **3.3 Purificação do eluato da ANX Sepharose FF (fração 350) em IMAC**

A coluna foi carregada um dia antes dos experimentos com CoCl<sub>2</sub> 0,1M ou ZnSO<sub>4</sub> 0,1M. Utilizando os pHs 5,0 e 6,0, as soluções preparadas foram: acetato 20mM contendo NaCl 500mM, acetato 20mM contendo NaCl 500mM e Imidazol 300mM, e acetato 20mM contendo NaCl 500mM e Imidazol 500mM. Nos experimentos em que se variou a concentração de NaCl das soluções de equilíbrio, a condutividade das soluções preparadas variando a concentração de NaCl de 250 até 500mM, variou entre 28,6mS/cm e 51,3mS/cm, conforme mostrado na tabela 6.

**Tabela 6** – Concentração de NaCl e condutividade das soluções de equilíbrio utilizadas nas purificações em IMAC-Co<sup>2+</sup> em pH 6,0.

<b>Tampão de Equilíbrio pH6</b>	<b>Condutividade:</b>
Acetato 20mM e NaCl 500mM	51,3mS/cm
Acetato 20mM e NaCl 400mM	44,4mS/cm
Acetato 20mM e NaCl 350mM	37,6mS/cm
Acetato 20mM e NaCl 320mM	34,6mS/cm
Acetato 20mM e NaCl 300mM	33,0mS/cm
Acetato 20mM e NaCl 250mM	28,6mS/cm

**Fonte:** Próprio autor, 2021.

Utilizando o pH 7,0 ou pH 8,0, as soluções preparadas foram: Tampão de equilíbrio (Tris-HCl 20mM contendo NaCl 500mM), Tampão Tris-HCl 20mM contendo NaCl 500mM e Imidazol 300mM e Tampão Tris-HCl 20mM contendo NaCl 500mM e Imidazol 500mM, cada uma com o pH correspondente a purificação.

As purificações foram realizadas com o fluxo de 2,5mL/min durante a aplicação da amostra e reequilíbrio, e 5mL/min durante a aplicação dos tampões, aplicando-se as soluções na sequência descrita a seguir: 15VC de tampão de equilíbrio, 7VC de amostra, 15VC de tampão de equilíbrio, 10VC de tampão contendo Imidazol 300mM e 10VC de tampão contendo Imidazol 500mM.

Após cada purificação, a coluna foi lavada da seguinte forma: 10VC de EDTA 0.05M em tampão Tris-HCl contendo NaCl 500mM, pH 8,0, 20VC de NaCl 0,9%, 20VC de NaCl 1,5M, 10VC de NaOH 1M, 20VC de NaCl 1.5M e 20VC de água purificada. Na lavagem dos tubos e do coletor do cromatógrafo, foram utilizados 240mL de NaOH 0.5M e 1,6L de água purificada (MilliQ). Todas as soluções preparadas foram filtradas em Stericup 0,22µm GV PVDF (Millipore, Estados Unidos).

### **3.4 Purificação do eluato da ANX Sepharose FF (fração 350) em HiTrap-SP**

O pool da fração 350 da coluna ANX Sepharose FF diluído 10 vezes foi utilizado como amostra de entrada na purificação de troca catiônica em coluna HiTrap-SP da GE (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) de 1mL. A coluna foi conectada

em uma bomba peristáltica Watson-Marlow Pumps 323E (Watson-Marlow Fluid Technology Group, Estados Unidos) através de uma mangueira MasterFlex L/S 14 (MasterFlex, Alemanha). O fluxo foi ajustado para 1mL/min.

A ativação da coluna foi feita da seguinte forma: 1VC de água purificada, 5VC de tampão de equilíbrio (fosfato 20mM e NaCl 25mM, pH 6.8), 5VC de tampão de equilíbrio, contendo NaCl 500mM, seguido de mais 5VC de tampão de equilíbrio.

As purificações foram realizadas aplicando-se as soluções na sequência descrita a seguir: 5VC de tampão de equilíbrio, 70VC de amostra (350mM diluído 10 vezes em água purificada), 15VC de tampão de equilíbrio, 10VC de tampão de equilíbrio contendo NaCl 500mM, 2VC de NaCl 1M, e 10VC de tampão de equilíbrio.

Para a limpeza da coluna, foram utilizados 2VC de NaCl 2M, 4VC de NaOH 1M, 2VC de NaCl 2M, 5VC de tampão de equilíbrio para abaixar o pH, 2VC de água purificada e por último, 4VC de etanol 20% em acetato de sódio 200mM para armazenamento da coluna.

Todas as soluções preparadas foram filtradas em Stericup 0,22µm GV PVDF (Millipore, Estados Unidos).

### **3.5 Purificação do FT1 da IMAC-Co<sup>2+</sup> pH 6,0 em Superdex 200**

Foi utilizado o FT1 da IMAC-Co<sup>2+</sup> pH 6,0 com solução de equilíbrio acetato 20mM contendo NaCl 250mM concentrado na ANX Sepharose FF. A coluna Superdex 200 já estava empacotada e antes da realização da purificação, o empacotamento da coluna foi avaliado com acetona 1% conforme o método descrito para a ANX Sepharose FF. Foi calculada a altura de um prato teórico e o fator de assimetria da coluna conforme as equações apresentadas no item 3.1.

Para realização da purificação, o fluxo utilizado foi de 1,5mL/min, e as soluções empregadas foram: 2VC de água purificada para remoção do Etanol 20% e 5VC de solução (acetato 20mM contendo NaCl 120mM, pH 6,0). Foram aplicados 2,8mL de amostra, seguida da sua eluição com 1,5VC de solução.

Para a limpeza da coluna, foram utilizados 1VC de NaOH 0,5M, 2VC de água purificada, 5VC de solução para abaixar o pH, 2VC de água purificada e 2VC de Etanol 20% para armazenamento. Todas as soluções preparadas foram filtradas em Stericup 0,22µm GV PVDF (Millipore, Estados Unidos).

### 3.6 Testes analíticos

Para os testes analíticos, utilizaram-se os seguintes equipamentos: fonte para eletroforese – Electrophoresis Power Supply EPS 301 da GE Healthcare (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e PowerPac HC – Power Supply da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Singapura); leitor de microplacas – LMR-96 da Loccus (Loccus, Brasil); densitômetro – DS-5000 da Loccus (Loccus, Brasil); sistema de transferência de proteínas – Trans-Blot Turbo Transfer System da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Singapura); Centrífuga – 5810R da Eppendorf (Eppendorf, Alemanha).

#### 3.6.1 Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

O método de Bradford é um método colorimétrico que quantifica as proteínas totais em uma determinada amostra. Para a realização do ensaio, foram utilizadas microplacas de 96 poços e as proporções utilizadas de amostra e reagente foram de 10  $\mu$ L de amostra para 200 $\mu$ L do reagente de Bradford, conforme informado pelo fabricante (Protein Assay Dye Reagent Concentrate – Bio-Rad Laboratories, Singapura). O reagente foi previamente diluído na proporção de 1 parte de reagente para 4 partes de água purificada, conforme o fabricante. As absorbâncias foram lidas em  $\lambda=595\text{nm}$ . A curva de calibração foi feita utilizando como padrão BSA 2mg/mL, diluído 4 vezes com salina (NaCl 0,9%) para que o intervalo linear ficasse entre 0,05mg/mL e 0,5mg/mL. Os valores de absorbância e concentração foram lançados em um gráfico. As diluições e concentrações dos pontos da curva de calibração estão descritos na tabela 7.

**Tabela 7** – Concentração do padrão BSA utilizado para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford e suas respectivas diluições.

<b>% BSA</b> <b>0,5mg/mL</b>	<b>BSA</b> <b>0,5mg/mL (<math>\mu</math>L)</b>	<b>NaCl 0,9% (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Concentração</b> <b>(mg/mL)</b>
<b>100</b>	10	-	0,500
<b>75</b>	30	10	0,375
<b>50</b>	10	10	0,250



<b>25</b>	10	30	0,125
<b>10</b>	10	90	0,050
<b>0</b>	0	10	0,000

**Fonte:** Adaptado de Bio-Rad Laboratories, 1994.

### 3.6.2 Quantificação de proteínas pelo método de Bradford – Microensaio

O microensaio é uma alternativa do método de Bradford para quantificar proteínas totais em uma amostra contendo entre 8µg/mL e 80µg/mL de proteínas. Para a realização do ensaio, foram utilizadas microplacas de 96 poços e as proporções utilizadas de amostra e reagente foram de 160 µL de amostra para 40µL do reagente de Bradford (Protein Assay Dye Reagent – Bio-Rad Laboratories, Singapura). A curva de calibração foi feita com BSA e a leitura em  $\lambda=595\text{nm}$ . Os pontos da curva de calibração estão mostrados na tabela 8.

**Tabela 8 –** Concentração do padrão BSA utilizado para a quantificação de proteínas pelo microensaio do método de Bradford e suas respectivas diluições.

<b>% BSA 80µg/mL</b>	<b>BSA 80µL/mL (µL)</b>	<b>NaCl 0,9% (µL)</b>	<b>Concentração (µL/mL)</b>
<b>100</b>	160	-	80
<b>75</b>	150	50	60
<b>50</b>	100	100	40
<b>25</b>	50	150	20
<b>10</b>	20	180	8
<b>0</b>	0	160	0

**Fonte:** Adaptado de Bio-Rad Laboratories, 1994.

### 3.6.3 Dosagem de imunoglobulinas por imunoturbidimetria

O ensaio turbidimétrico teve como finalidade quantificar as imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) presentes nas amostras. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços e as proporções, assim como volumes utilizados dos reagentes para a dosagem de cada imunoglobulina estão descritas na tabela 9.

**Tabela 9** – Quantidade de reagente e amostra utilizados para a dosagem de imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM) por imunoturbidimetria.

Dosagem	Reagente ( $\mu\text{L}$ )	Amostra ( $\mu\text{L}$ )	Incubação
IgA	200	3,2	5 minutos
IgG	250	2,0	10 minutos
IgM	200	12	5 minutos

**Fonte:** Adaptado de Topkal Multi Turbi, Kovalent, 2015.

Os reagentes utilizados foram: IgA Mono, IgG Mono e IgM Mono, todos produzidos pela Kovalent (BioSys/Kovalent, Brasil), sendo a leitura das absorvâncias realizada em  $\lambda=340\text{nm}$ . A curva de calibração foi feita com o padrão Topkal MultiTurbi da Kovalent (BioSys/Kovalent, Brasil), com as diluições 1:10,1:15,1:20,1:40,1:160.

#### 3.6.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida é um método utilizado para verificar o perfil proteico das amostras após sua aplicação em um gel poroso. As amostras aplicadas são submetidas a um campo elétrico. A presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) garante que as proteínas sejam desnaturadas e possuam uma carga negativa. Assim, todas as proteínas migram para o polo positivo, garantindo sua separação pelo peso molecular.

As soluções utilizadas para a eletroforese foram: Tampão de amostra 5x – SDS (10% p/v), azul de bromofenol (0,05% p/v) dissolvidos em 6,2mL de Tampão Tris-HCl (0,31mM) pH 6,8,  $\beta$ -mercaptoetanol (7% v/v), glicerina (50% v/v) e água purificada (50%). A proporção de tampão de amostra 5x para as amostras aplicadas no gel foram de 10 $\mu\text{L}$  de tampão 5x e 40 $\mu\text{L}$  de amostra. Para tampão de amostra 5x não redutor, o  $\beta$ -mercaptoetanol foi removido do preparo.

Tampão de corrida 1x – Tris-Base (0,25M p/v), glicina (1,92M p/v), SDS (1% p/v) e água purificada. Para utilização do tampão de corrida, é necessário diluir 10 vezes em água purificada.

Solução corante – sulfato de alumínio (14-18) H<sub>2</sub>O (5% p/v) dissolvidos em água purificada, etanol 96% (10% v/v), Coomassie Brilliant Blue G-250 0,02% (p/v) e ácido orto fosfórico 85% (2% v/v).

Solução descorante – Etanol 96% (10% v/v), ácido orto fosfórico 85% (2% v/v) e água purificada.

Os géis foram preparados na concentração de 7.5% ou 10%, com 1mm de espessura, conforme descrito na tabela 10, utilizando para a confecção, o sistema mini Protean da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos). O primeiro gel a ser preparado foi o gel de separação, sendo rapidamente aplicado no sistema, seguido por isopropanol para garantir que o gel ficasse alinhado e sem bolhas. Após a polimerização, o isopropanol foi removido do sistema e o gel foi lavado com água para eliminar o álcool e seco com papel filtro antes da aplicação do gel de empilhamento até o topo do sistema. Um pente para 10 amostras foi colocado para que houvesse a formação dos poços e após a polimerização do gel, que foi observada a partir da quantidade restante no tubo de centrifuga de 50mL, removemos o pente e o gel foi colocado na cuba. O tampão de corrida foi adicionado de acordo com a marcação indicada, tomando o cuidado de cobrir todo o gel e em seguida, foram aplicadas as amostras nos poços correspondentes.

**Tabela 10 – Reagentes utilizados para o preparo de um gel SDS-PAGE.**

<b>Reagentes</b>	<b>Gel de Separação 7.5%</b>	<b>Gel de Separação 10%</b>	<b>Gel de empilhamento 4%</b>
<b>Solução acrilamida 30%, bisacrilamida 0,8%</b>	1,25 mL	1,67 mL	325 µL
<b>Tampão Tris-HCl 1,5M, SDS 0,4%, pH 8,8 (4x)</b>	1,25 mL	1,25 mL	-
<b>Tampão Tris-HCl 0,5M, SDS 0,4%, pH 6,8 (4x)</b>	-	-	0,625 mL
<b>H<sub>2</sub>O purificada</b>	2,5 mL	2 mL	1,5 mL
<b>Persulfato de amônio</b>	33,3 µL	50 µL	25 µL

<b>10% (APS)</b>			
<b>N,N,N',N'- tetrametiletileno1,2- diamina (TEMED)</b>	7,5 µL	7,5 µL	5 µL
<b>Volume total</b>	5 mL	5 mL	2,5 mL

**Fonte:** Adaptado de Bio-Rad Laboratories, 1994.

Foi utilizado NaCl 0,9% na diluição das amostras necessárias, e a partir desta diluição, foram adicionados 10 µL de tampão de amostra 5x em 40 µL de amostra diluída. Estas foram homogeneizadas no vortex, submetidas a um “spin” na centrífuga e depois fervidas entre 98-100°C por 10 minutos. As amostras que precisavam ser concentradas foram precipitadas com acetona gelada na proporção 1:4 (amostra:acetona), permanecendo por 10 minutos no congelador, em seguida mais 10 minutos na centrífuga à 4°C, 7000rpm. Os eppendorfs foram retirados da centrífuga com cuidado para não perder o pellet e após remover a acetona, o pellet é ressuspenso com 40 µL de NaCl 0,9% e 10 µL de tampão de amostra 5x. Estas amostras também foram homogeneizadas no vortex, submetidas a um “spin” na centrífuga e depois fervidas entre 98-100°C por 10 minutos.

Os géis foram deixados à 90V por aproximadamente 20 minutos e 180V até o final da corrida. Em seguida, os géis foram cuidadosamente tirados do sistema e deixados no corante por aproximadamente 2 horas em agitação, e em seguida, descorados com o descorante por aproximadamente 1 hora. Os géis foram escaneados usando o densitômetro DS-5000 da Loccus, com o programa Lpix Image.

### 3.6.5 Western Blot

Para avaliar a presença de IgA, IgG e IgM nas frações obtidas nas purificações, aplicou-se a técnica de Western Blot. Para essa técnica, foi realizado o preparo dos géis como foi descrito no item 3.2.4, e as soluções e reagentes utilizados foram: TBS-T (Tris 10mM, NaCl 150mM, Tween-20 0,05%, qsp H<sub>2</sub>O

purificada, pH 7,4); Leite em pó desnatado (Molico, Nestlé); BSA (albumina de soro bovino) (Merck, Alemanha).

Padrões: IgM Humano (I8260. Sigma, EUA), IgG Humano (I4560. Sigma, EUA), IgA Humano (I4036. Sigma, EUA) e Imunoglobulin® Ig Humana (353021001. Blau Farmacêutica, Brasil).

Anticorpos: Anti-IgG Humano Peroxidase produzido em cabra (474-1006. SeraCare, EUA), Anti-IgM Humano Peroxidase produzido em cabra (474-1003. KPL, EUA), Anti-IgA Humano produzido em cabra (I1261. Sigma, EUA) e Anti-IgG de Cabra Peroxidase produzido em rato (A8919. Sigma, EUA).

Após a corrida do gel, o mesmo foi colocado em contato com uma membrana de PVDF 0,2µm da Bio-Rad para transferência das proteínas. A transferência foi realizada no Trans-Blot Turbo Transfer System da Bio-Rad, com uma corrente de 1,3A, 25V por 7 minutos.

Para detecção de IgM, após o bloqueio "overnight" com solução TBS-T contendo 10% de leite em pó desnatado e 1% de BSA, as membranas foram incubadas com solução TBS-T com 10% de leite com o Anti-IgM Humano Peroxidase produzido em cabra (KPL), na diluição 1:20000, por 2 horas.

Para detecção de IgG, após o bloqueio "overnight" com solução TBS-T contendo 10% de leite em pó desnatado e 1% de BSA, as membranas foram incubadas com solução TBS-T com 10% de leite com o Anti-IgG Humano Peroxidase produzido em cabra (KPL), na diluição 1:10000, por 2 horas.

Para a detecção de IgA, as membranas foram colocadas em solução TBS-T contendo 10% de leite em pó desnatado e 1% de BSA por 2 horas, e incubadas "overnight" com solução TBS-T com 10% de leite com o Anti-IgA Humano produzido em cabra (Sigma), na diluição 1:20000. Após 3 lavagens de 10 minutos cada com solução TBS-T, as membranas foram incubadas com o segundo anticorpo, diluído na proporção 1:25000 em solução TBS-T com 10% de leite.

Após as incubações, tanto as membranas de IgM quanto de IgA e IgG foram lavadas 3 vezes por 10 minutos cada, com solução TBS-T para que a revelação pudesse ser realizada.

A revelação das membranas foi realizada utilizando o kit TMB Membrane Peroxidase (KPL). A solução utilizada para revelação é um mix contendo 0,2mL do Enhancer, 1mL do TMB Peroxidase Substrate e 1mL do Peroxidase Substrate Solution B, que precisavam estar em temperatura ambiente antes de serem

misturados para revelar as proteínas presentes nas membranas. Para IgM, IgG e IgA, a revelação foi observada em 5, 5 e 8 minutos respectivamente, e a reação foi interrompida adicionando água destilada às membranas. As membranas foram escaneadas em densitômetro DS-5000 da Locus, com o programa Lpix Image.

## 4 RESULTADOS

Neste trabalho, foram avaliadas diferentes técnicas para a purificação da imunoglobulina M. O plasma foi aplicado em uma coluna de gel filtração com a resina Sepharose 4FF, seguida pela coluna de troca aniônica com a resina ANX Sepharose-FF.

A partir da fração 350mM advinda da troca aniônica, começaram-se as purificações em coluna His-Trap de afinidade ao metal (IMAC), utilizando cobalto e zinco, com diferentes pHs e condutividades de tampões. Essa mesma fração foi utilizada em coluna Hi-Trap SP, de troca catiônica.

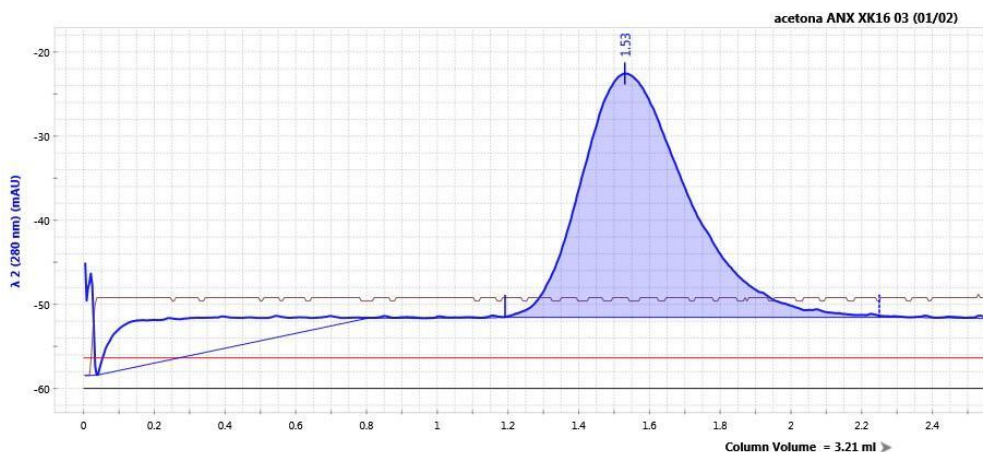
O FT1 adquirido a partir da IMAC, utilizando tampão de equilíbrio com 250mM de NaCl em pH 6,0, também foi utilizado como estratégia para maior pureza de IgM, utilizando colunas de troca aniônica e gel filtração, respectivamente.

### 4.1 Empacotamento da ANX Sepharose FF

Empacotamos uma coluna de ANX Sepharose FF de 3,21mL. O teste de eficiência do empacotamento foi realizado, aplicando acetona a 1%.

Os resultados obtidos foram: Altura de um prato teórico (HEPT) =  $1,26 \times 10^{-4}$ ; Número de pratos teóricos (N) = 127,08; Número de pratos teóricos por metro de resina (N/m) = 7942,5; Fator de assimetria da coluna (As) = 1,57.

**Figura 9** – Teste de eficiência do empacotamento utilizando acetona a 1% em coluna XK16 empacotada com ANX Sepharose FF.



Fonte: Próprio autor, 2021.

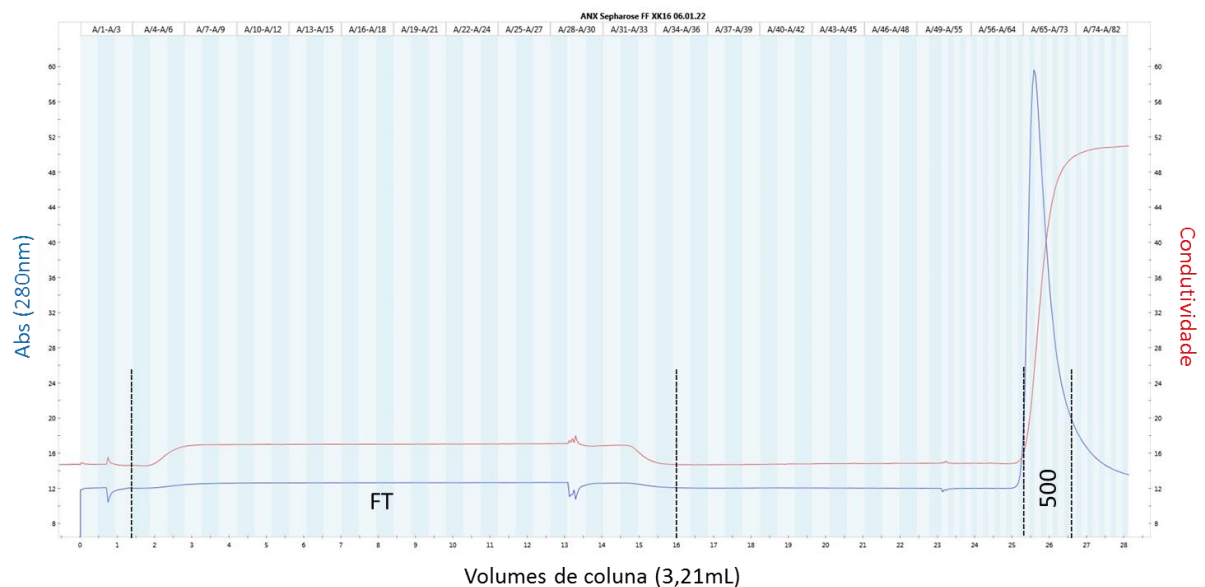
## 4.2 Concentração de FT1 da purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> pH 6,0 em ANX-Sepharose FF

Para que fosse possível aumentar a pureza de IgM a partir da FT-1 da purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> pH 6,0 em uma coluna de gel filtração foi necessário concentrar o FT-1 em ANX Sepharose FF.

Na figura 10, encontra-se o cromatograma relacionado à concentração, onde podemos observar o FT-1, correspondente às proteínas que não adsorveram à coluna, e o 500, correspondente às proteínas, dentre elas o IgM, que foram eluídas com solução de acetato de sódio 20mM contendo NaCl 500mM.

As amostras foram coletadas em eppendorfs de 1,5mL, para que nossa fração de interesse, no caso o 500, não fosse diluída.

**Figura 10** – Cromatograma da concentração em ANX Sepharose-FF em pH 6,0, utilizando o FT-1 da purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> pH 6,0 contendo NaCl 250mM.



Fonte: Próprio autor, 2021.

**Alíquotas:** FT (A4 até A34); 500 (A65 até A72).

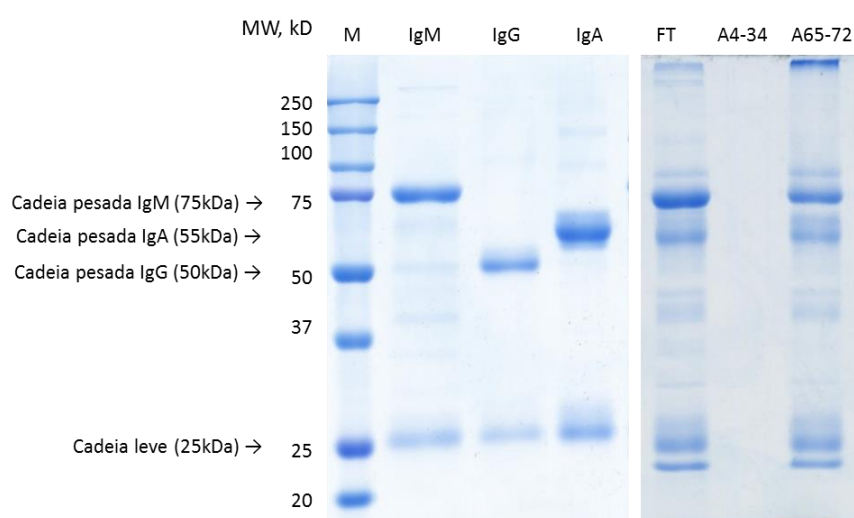
Após a concentração da nossa amostra de entrada e a formação de alíquotas, um gel de poliacrilamida 10% foi feito, utilizando nossa amostra de



entrada e as frações coletadas. A fração que reuniu os tubos A4-A43 não apresentou bandas, possivelmente porque as proteínas estavam muito diluídas.

A fração que reuniu os tubos A65-A72 apresentou perfil semelhante da FT-1 e foi concentrada aproximadamente 6,1 vezes na coluna ANX Sepharose FF.

**Figura 11** – Análise do gel de poliacrilamida 10% com amostras redutoras advindas da ANX-Sepharose FF.



**Fonte:** Próprio autor, 2021.

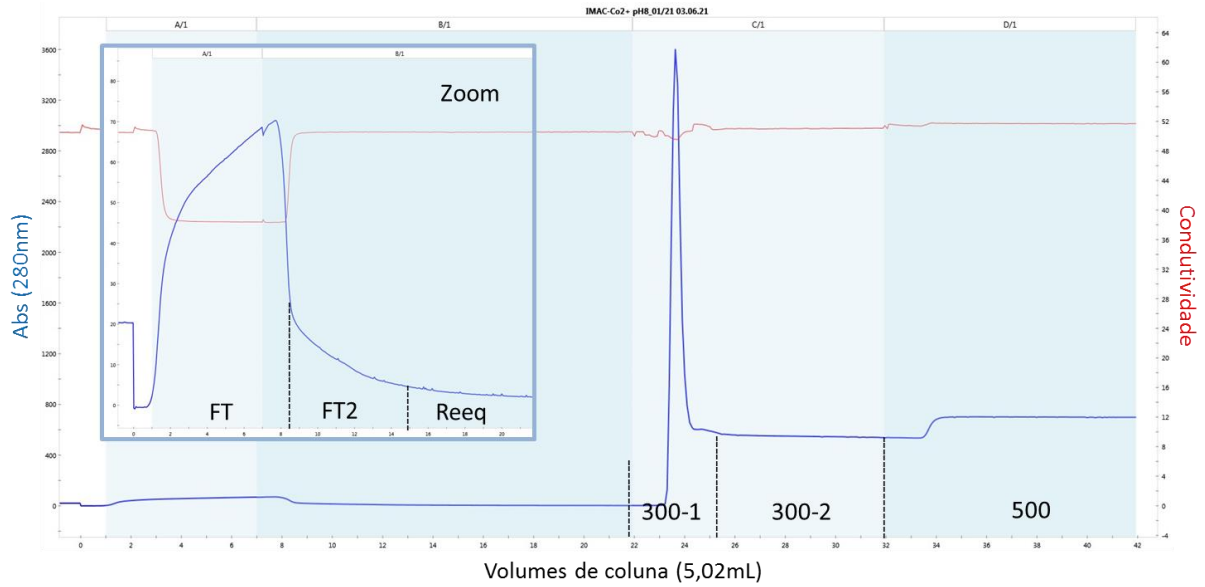
M: Padrão de massa molecular; FT1 (4,94 µg – concentrado 3x), A65-72 (2,20 µg – concentrado 3x).

### 4.3 Purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup>

Visando obter maior pureza de IgM, a purificação utilizando a coluna de afinidade a metal foi utilizada no cromatógrafo NGC Discover Chromatography Systems da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Singapura), controlado por ChromLab Software. Os cromatogramas para os pHs 8,0, 7,0, 6,0 e 5,0 podem ser observados nas figuras 12, 13, 14 e 15 respectivamente. De acordo com os resultados, parte das proteínas não se ligam a coluna, saindo no FT-1, e as proteínas que se ligaram à coluna eluíram com tampão contendo Imidazol 300mM.

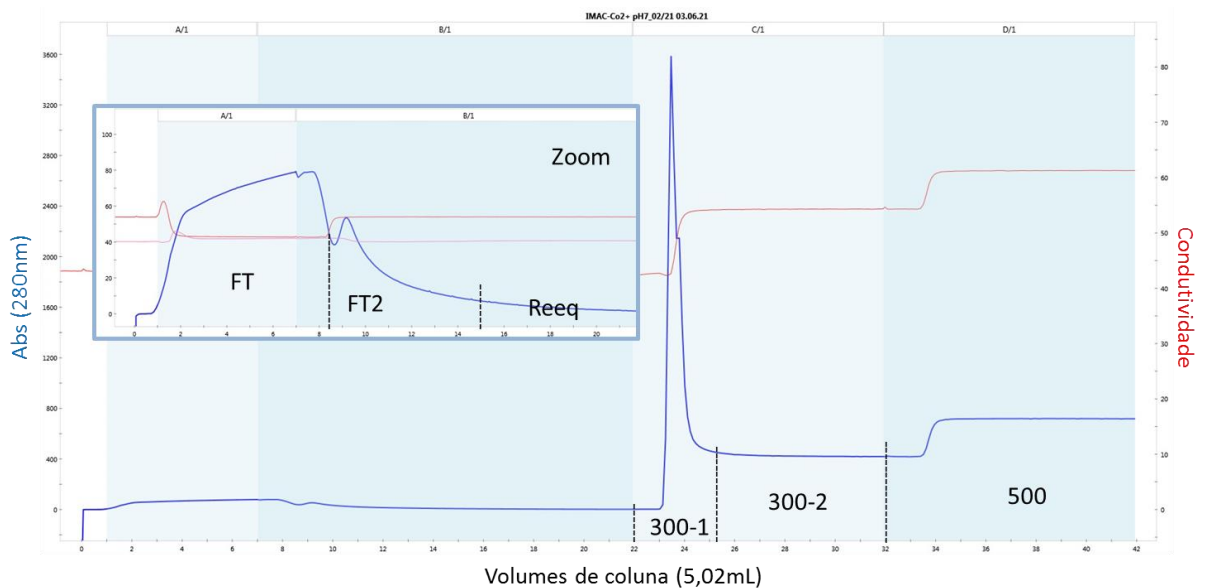
Observa-se que após o final do FT-1 tem-se um novo pico que denominamos de FT2 que aumenta com a diminuição do pH. Logo, esse resultado nos indica que a afinidade das proteínas a coluna está relacionada ao pH; quanto menor o pH, menor a afinidade.

**Figura 12** – Cromatograma da purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> em pH 8,0. FT1, FT2 e Reequilíbrio estão apresentados de forma ampliada.



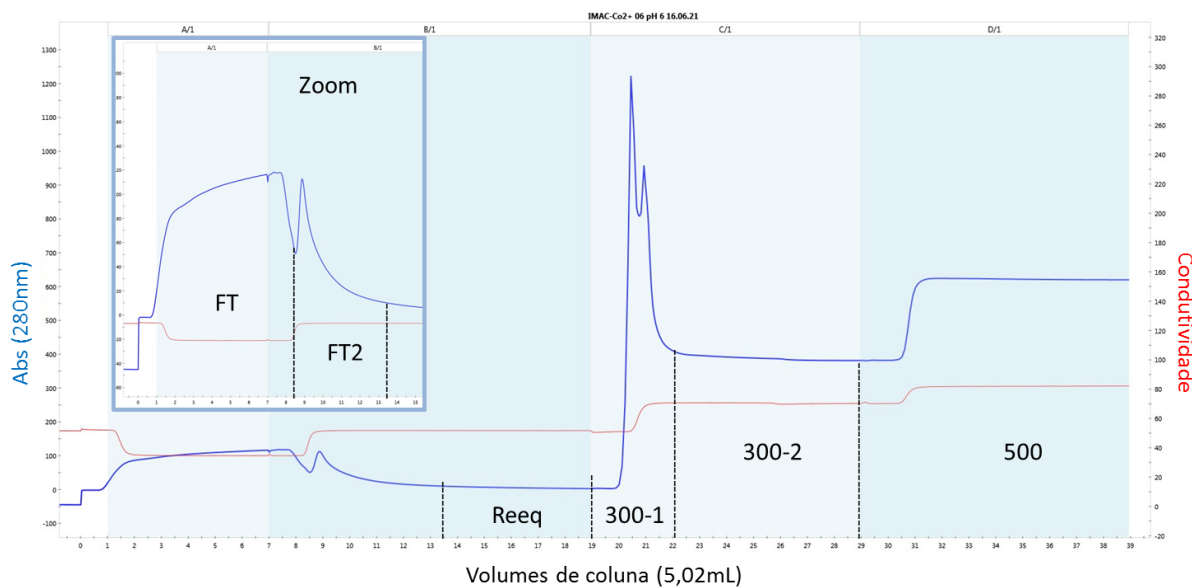
Fonte: Próprio autor, 2021.

**Figura 13** – Cromatograma da purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> em pH 7,0. FT1, FT2 e Reequilíbrio estão apresentados de forma ampliada.



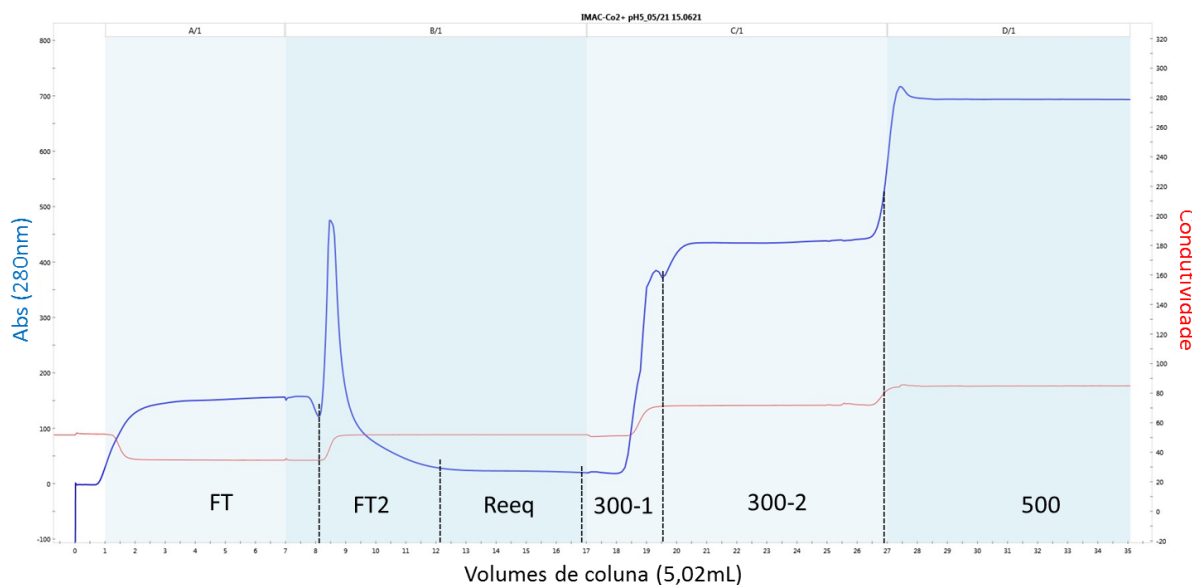
Fonte: Próprio autor, 2021.

**Figura 14** – Cromatograma da purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> em pH 6,0. FT1 e FT2 estão apresentados de forma ampliada.



Fonte: Próprio autor, 2021.

**Figura 15** – Cromatograma da purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> em pH 5,0.



Fonte: Próprio autor, 2021.

Após cada purificação, foram realizados testes com o intuito de dosar a quantidade de proteína que foi recuperada em cada fração utilizando o método de

Bradford. Os resultados estão demonstrados na tabela 11, onde observamos que a maior parte das proteínas fica adsorvida na coluna nos pHs 7,0 e 8,0 como mostrado nos cromatogramas, enquanto no pH 5,0 e 6,0, temos uma maior quantidade de proteínas eluídas no FT1, corroborando o que foi observado: quanto menor o pH, menor a afinidade das proteínas com a coluna.

**Tabela 11** – Proteínas totais obtidas pelo método de Bradford para as frações das purificações em IMAC Co<sup>2+</sup> em pHs 8,0, 7,0, 6,0 e 5,0, respectivamente, e a porcentagem de recuperação dessas proteínas em relação à amostra de entrada (350).

Amostra	pH 8,0				pH 7,0			
	Volume (mL)	[prot.] amostra (mg/mL)	Prot ttl (mg)	% Rec	Volume (mL)	[prot.] amostra (mg/mL)	Prot ttl (mg)	% Rec
350	35	0,39	13,57	100,0	35	0,44	15,26	100,0
FT-1	42	0,07	2,82	20,1	39	0,09	3,40	22,3
FT-2	40	0,01	0,50	4,0	43	0,03	1,12	7,3
300-1	22	0,29	6,25	45,1	20	0,46	9,13	59,8
300-2	31	0,03	0,74	5,6	34	0,01	0,20	1,3
				<b>74,9</b>				<b>90,7</b>
Amostra	pH 6,0				pH 5,0			
	Volume (mL)	[prot.] amostra (mg/mL)	Prot ttl (mg)	% Rec	Volume (mL)	[prot.] amostra (mg/mL)	Prot ttl (mg)	% Rec
350	35	0,330	11,57	100,0	35	0,33	11,54	100,0
FT-1	30	0,133	3,99	34,5	38	0,17	6,45	55,9
FT-2	28	0,036	1,01	8,8	45	0,08	3,56	30,8
300-1	9,5	0,188	1,79	15,5	28	0,04	1,09	9,4
300-2	12,5	0,297	3,71	32,1	16	0,00	0,00	0,0
				<b>90,8</b>				<b>96,2</b>

**Fonte:** Próprio autor, 2021.

A variação da quantidade de proteína na amostra de entrada das purificações mostrada na tabela 11 pode estar relacionada com o tempo de reação entre a amostra e o reagente, assim como o tempo para a dosagem das proteínas pelo espectrofotômetro.

Foram realizados testes turbidimétricos para dosagem de imunoglobulinas IgA, IgG e IgM.

Os resultados da dosagem de IgM estão listados na tabela 12, onde podemos observar que IgM, nossa proteína de interesse, se encontra em maior quantidade no FT-1 nos pHs 6,0, e 5,0 se compararmos com as demais frações, demonstrando que IgM apresentou baixa afinidade pela coluna. Em pH 7,0, IgM foi recuperado mais na fração 300-1 do que no FT-1, indicando que houve maior absorção de IgM na coluna, sendo removido junto com outras proteínas com a eluição do tampão contendo Imidazol 300mM. Em pH 8,0, provavelmente a dosagem de IgM em 300-1 está subestimada, uma vez que seguindo a tendência observada nos pHs 5,0, 6,0 e 7,0, de aumento da adsorção de IgM com o aumento de pH, a quantidade de IgM adsorvida deveria ser maior do que a observada em pH 6,0. A baixa recuperação total de IgM (47,91%) está de acordo com esta observação.

A presença de IgA e IgG não foram detectadas nas frações coletadas devido à baixa concentração dessas imunoglobulinas nas amostras, não sendo possível sua detecção por turbidimetria.

**Tabela 12** – Concentração de IgM e IgM totais obtidos em imunoturbidimetria para as frações das purificações em IMAC Co<sup>2+</sup> em pHs 8,0, 7,0, 6,0 e 5,0, e a porcentagem de recuperação dessas proteínas em relação à amostra de entrada (350).

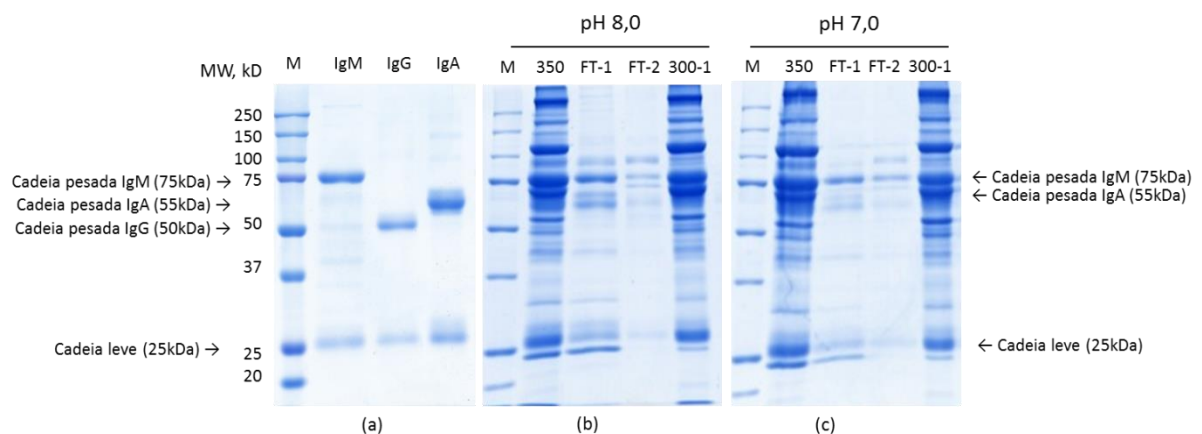
Amostra	pH8				pH7			
	Volume (mL)	Conc IgM (mg/ml)	IgM total (mg)	% Rec IgM	Volume (mL)	Conc IgM (mg/ml)	IgM total (mg)	% Rec IgM
350	35	0,22	7,65	100,0	35	0,23	8,07	100,0
FT-1	42	0,06	2,62	34,24	39	0,06	2,16	26,77
FT-2	40	0,00	0,13	1,73	43	0,02	0,85	10,55
300-1	22	0,04	0,91	11,94	20	0,17	3,40	42,13
300-2	31	0,00	0,00	0,00	34	0,00	0,00	0,00
				<b>47,91</b>				<b>79,44</b>
Amostra	pH6				pH5			
	Volume (mL)	Conc IgM (mg/ml)	IgM total (mg)	% Rec IgM	Volume (mL)	Conc IgM (mg/ml)	IgM total (mg)	% Rec IgM
350	35	0,17	5,92	100,0	35	0,22	7,59	100,0
FT-1	30	0,06	2,40	40,54	38	0,13	4,97	65,46
FT-2	28	-0,01	0,00	0,00	45	0,01	0,46	6,08
300-1	9,5	0,04	1,09	18,40	28	0,00	0,00	0,00
300-2	12,5	0,08	0,76	12,79	16	0,00	0,00	0,00
				<b>71,76</b>				<b>71,53</b>

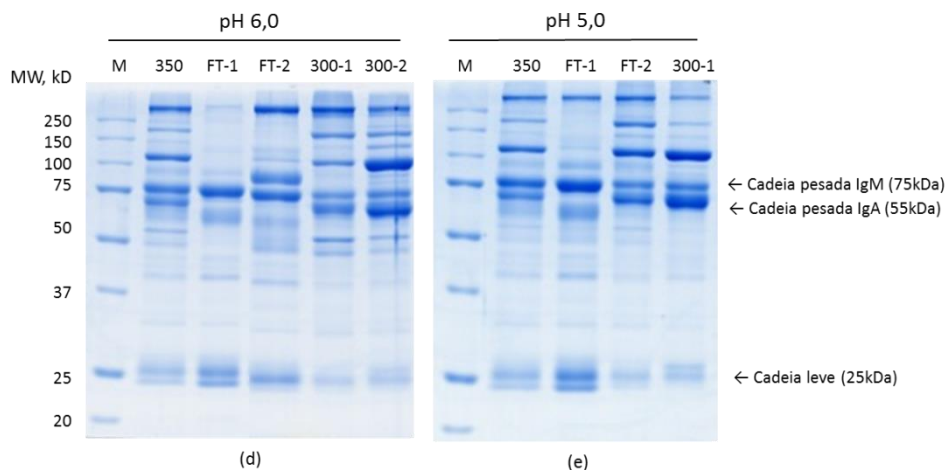
Fonte: Próprio autor, 2021.

Analisando os géis de poliacrilamida que foram realizados em condições redutoras (figura 16), podemos observar que apesar de IgA e IgG não serem detectados pelos testes turbidimétricos, a cadeia pesada de IgA (55kDa) pode ser observada nos géis.

Em nenhum dos pHs analisados foi possível obter IgM totalmente no FT-1 ou totalmente adsorvido. A Tabela 12 mostra que em pH 6,0 obtivemos a melhor recuperação de IgM (40,54%) no FT-1 em comparação com os pHs 7,0 (26,77%) e 8,0 (34,24%). Embora a recuperação de IgM no FT-1 em pH 5,0 (65,46%) tenha sido maior do que em pH 6,0, a figura 16 mostra que há uma banda de alta massa molecular no FT-1 do pH 5,0, que não está presente no FT-1 do pH 6,0. Concluimos assim que o experimento em pH 6,0 apresentou o melhor resultado.

**Figura 16** – Análise em gel de poliacrilamida a 10%, em condições redutoras das purificações em IMAC-Co<sup>2+</sup>.





**Fonte:** Próprio autor, 2021.

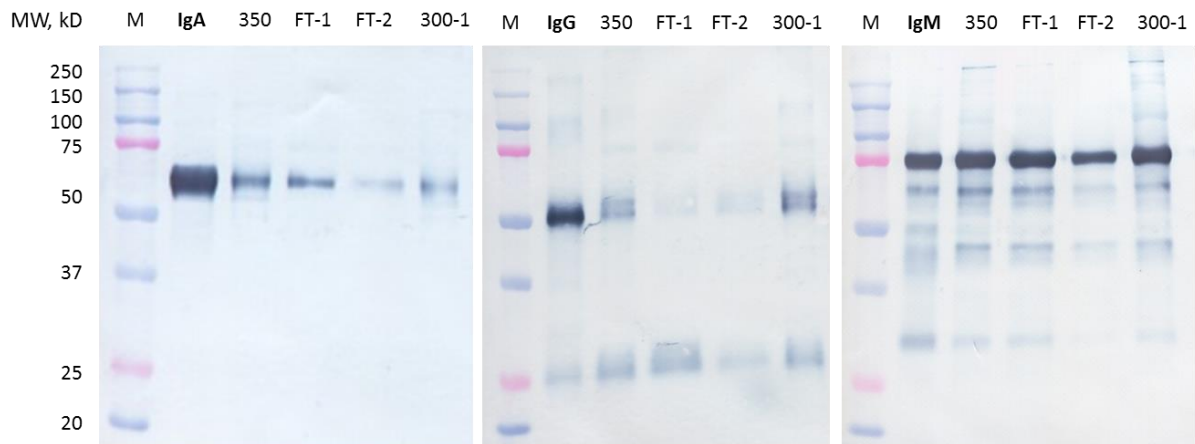
(a) M: Padrão de massa molecular; Padrões: IgM (1,9 µg); IgG (2,4 µg); IgA (1,6 µg). (b) **pH 8,0:** 350 (14 µg – concentrado 3x); FT1 (13 µg – concentrado 5x); FT2 (2,5 µg – concentrado 5x); 300-1 (14 µg – concentrado 4x). (c) **pH 7,0:** 350 (4,7 µg – concentrado 3x); FT1 (5,4 µg – concentrado 5x); FT2 (2,1 µg – concentrado 5x); 300-1 (5,5 µg – concentrado 3x); (d) **pH 6,0:** 350 (4,6 µg); FT1 (4,9 µg – concentrado 3x); FT2 (5,6 µg – concentrado 7x); 300-1 (5,4 µg – concentrado 2x); 300-2 (8,3 µg – concentrado 2x). (e) **pH 5,0:** 350 (3,9 µg); FT-1 (4,6 µg – concentrado 3x); FT-2 (4,8 µg – concentrado 5x); 300-1 (3,7 µg – concentrado 7x).

A análise em Western Blot foi realizado para as amostras das purificações de pH 7,0, 6,0 e 5,0, a fim de confirmarmos a presença das imunoglobulinas analisadas. Devido à alta sensibilidade do teste, podemos confirmar a presença da nossa proteína de interesse e de IgA e IgG, que não foram detectadas por turbidimetria.

IgM aparece em todos os pHs em todas as frações analisadas. Somente em pH 5,0 é possível observar a maior tendência de IgM estar mais presente no FT-1 do que em 300mM, isto é, de estar menos adsorvido à coluna.

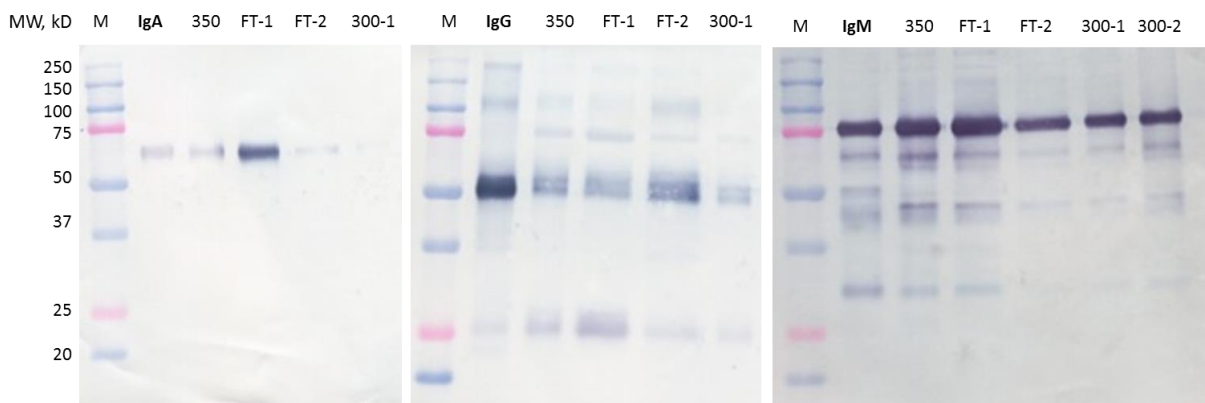
IgG e IgA também apareceram nas frações. IgA fica adsorvido à coluna somente em pH 7,0. Nos pHs 5,0 e 6,0, IgA somente foi observado no FT1. IgG ligou-se à coluna em pH 7,0. Em pH 6,0 aparece nas frações adsorvidas e não adsorvidas, e em pH 5,0 não ficou adsorvido à coluna.

**Figura 17** – Western Blot para a detecção de IgA, IgG e IgM, respectivamente, das frações coletadas na purificação IMAC  $\text{Co}^{2+}$  pH 7,0.



**Fonte:** Próprio autor, 2021.

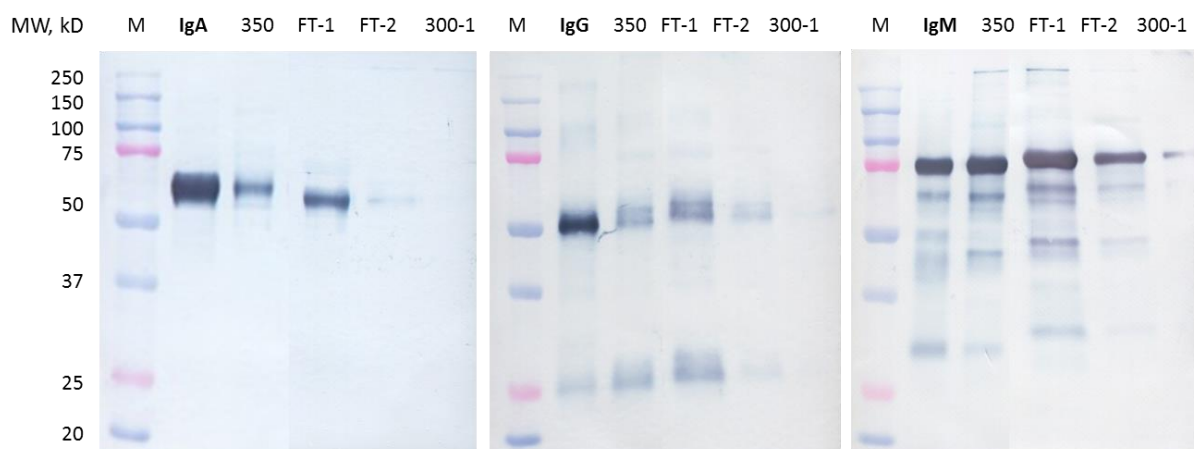
**Figura 18** – Western Blot para a detecção de IgA, IgG e IgM, respectivamente, das frações coletadas na purificação IMAC  $\text{Co}^{2+}$  pH 6,0.



**Fonte:** Próprio autor, 2021.



**Figura 19** – Western Blot para a detecção de IgA, IgG e IgM, respectivamente, das frações coletadas na purificação IMAC  $\text{Co}^{2+}$  pH 5,0.



**Fonte:** Próprio autor, 2021.

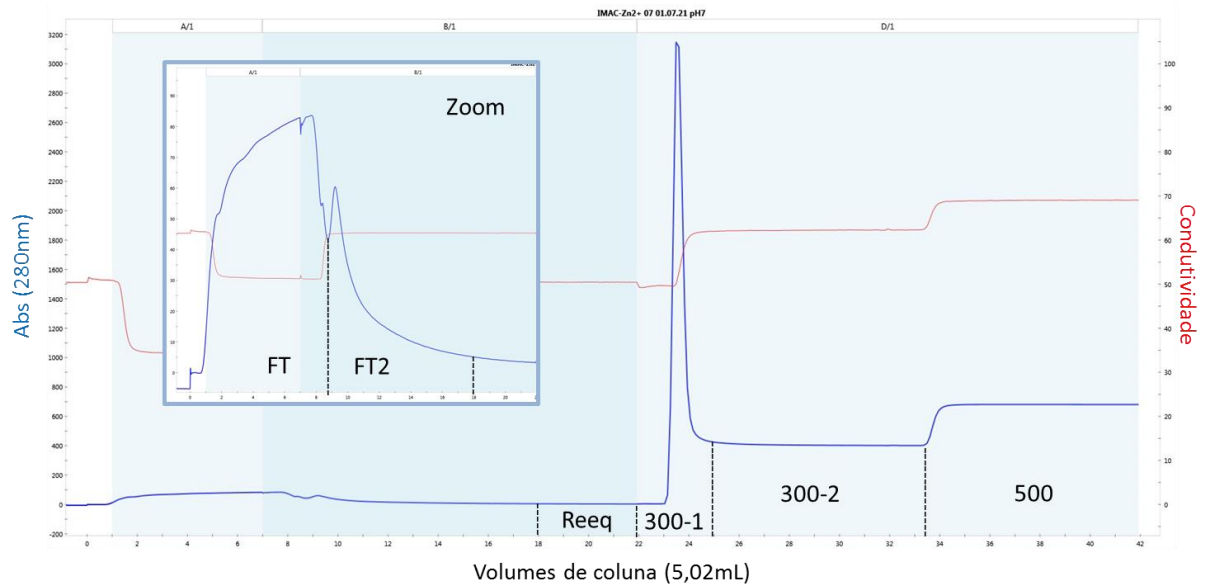
Com os resultados obtidos, podemos dizer que a purificação utilizando o pH 7,0 e 6,0 foram mais satisfatórias, apresentando um FT-1 com menor número de contaminantes. Comparando o gel do pH 7,0 e 6,0, observamos que o FT-1 do gel do pH 6,0 apresenta menos contaminantes do que o gel do pH 7,0, sendo o pH escolhido para trabalharmos.

#### 4.4 Purificação em IMAC- $\text{Zn}^{2+}$

Os cromatogramas correspondentes às purificações em IMAC- $\text{Zn}^{2+}$  em pH 6,0 e 7,0, são observados nas figuras 20 e 21, respectivamente. Assim como nas purificações com IMAC- $\text{Co}^{2+}$ , observa-se que parte das proteínas não se liga à coluna, saindo no FT, enquanto as proteínas que ligaram, foram eluídas com tampão contendo 300mM de Imidazol.

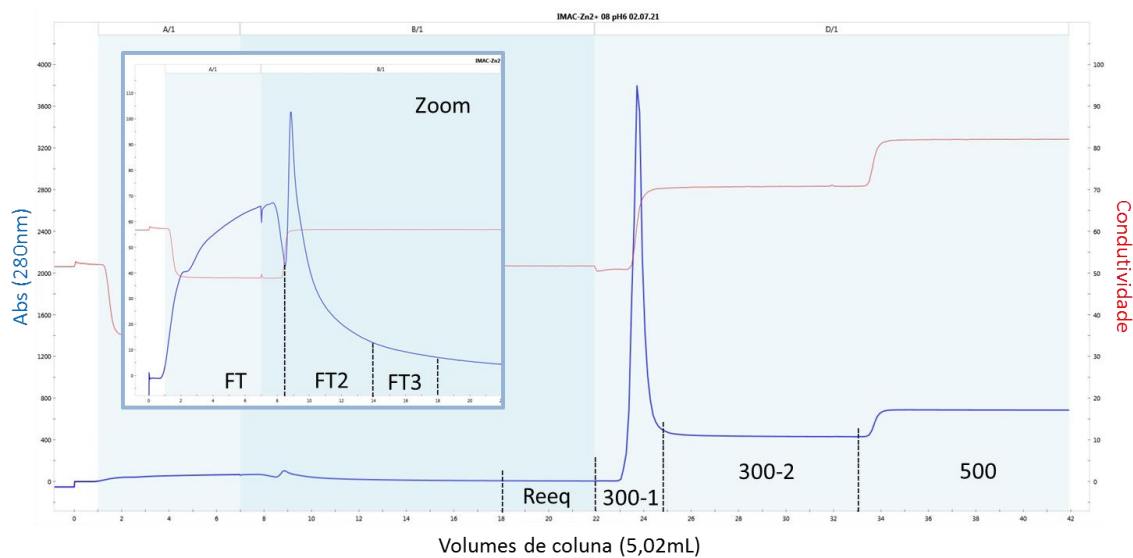
O pico FT2 observado em pH 6,0 é menor que o observado em pH 7,0. Portanto, as proteínas em pH 7,0 interagiram mais fortemente à coluna do que em pH 6,0. O efeito do aumento da afinidade das proteínas à coluna com o aumento do pH também foi observado nas purificações empregando IMAC- $\text{Co}^{2+}$ .

**Figura 20** – Cromatograma da purificação em IMAC-Zn<sup>2+</sup> em pH 7,0. FT-1, FT2 e FT3 estão apresentados de forma ampliada.



Fonte: Próprio autor, 2021.

**Figura 21** – Cromatograma da purificação em IMAC-Zn<sup>2+</sup> em pH 6,0. FT-1 e FT2 estão apresentados de forma ampliada.



Fonte: Próprio autor, 2021.

Na dosagem de proteínas pelo método de Bradford mostrado na tabela 13, indica que a quantidade de proteínas adsorvidas à coluna foi maior em pH 6,0 (60,8mg) do que em pH 7,0 (48,5mg). Portanto, não foi observado um aumento da

afinidade de proteínas à coluna com o aumento do pH nas purificações em IMAC-Zn<sup>2+</sup>.

**Tabela 13** – Proteínas totais obtidas pelo método de Bradford para as frações das purificações em IMAC Zn<sup>2+</sup> em pHs 7,0 e 6,0 e a porcentagem de recuperação dessas proteínas em relação à amostra de entrada (350).

Amostra	pH 7,0				pH 6,0			
	Volume (mL)	[prot.] amostra (mg/mL)	Prot ttl (mg)	% Rec	Volume (mL)	[prot.] amostra (mg/mL)	Prot ttl (mg)	% Rec
350-1	35	0,382	13,36	100,0	35	0,389	13,62	100,0
FT-1	31	0,086	2,65	19,9	38	0,060	2,28	16,7
FT-2	45	0,024	1,06	8,0	28	0,046	1,28	9,4
FT-3	-	-	-	-	18	0,009	0,15	1,1
300-1	13	0,484	6,30	47,1	18	0,460	8,28	60,8
300-2	39	0,005	0,19	1,4	-	-	-	-
				<b>76,4</b>				<b>88,0</b>

**Fonte:** Próprio autor, 2021.

A dosagem de IgM por turbidimetria mostrado na tabela 14 indica que em pH 7,0 33,3% foram recuperados no FT e 35,9% foi recuperado nas frações das proteínas adsorvidas à coluna (300-1 e 300-2). Portanto, aproximadamente metade da IgM recuperada foi adsorvida à coluna e metade não. Entretanto, somente 70% da IgM foi recuperada e os 30% restantes podem estar tanto no FT como na fração 300.

Em pH 6,0, 58,5% de IgM eluiu com imidazol 300 mM e 31,5% no FT. Este resultado indica que em pH 6,0 IgM ligou-se fortemente à coluna IMAC-Zn<sup>2+</sup>

Não foi possível realizar a dosagem de IgG e IgA por turbidimetria porque a concentração destas proteínas nas amostras estavam abaixo da faixa de detecção.

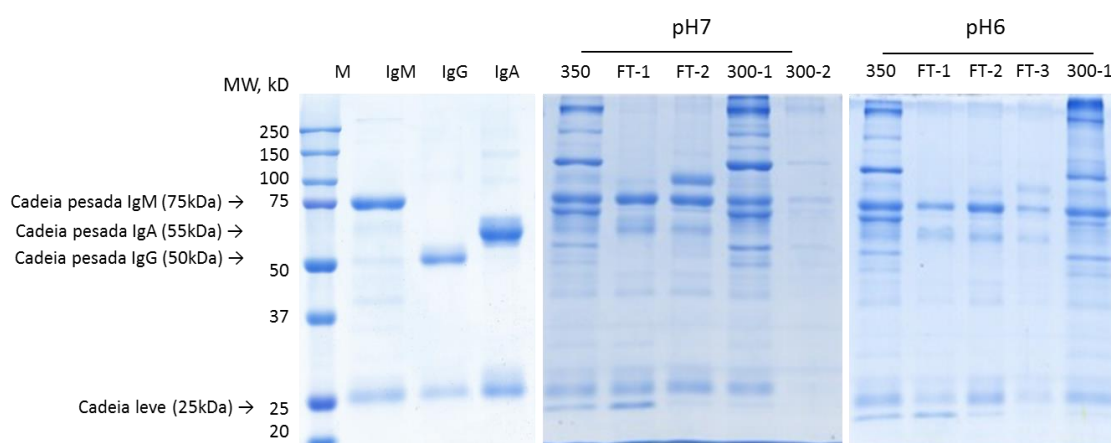
**Tabela 14** – Concentração de IgM e IgM totais obtidos em imunoturbidimetria para as frações das purificações em IMAC Zn<sup>2+</sup> em pHs 7,0 e 6,0, e a porcentagem de recuperação dessas proteínas em relação à amostra de entrada (350).

Amostra	pH 7,0				pH 6,0			
	Volume (mL)	[IgM] amostra (mg/mL)	IgM total (mg)	% Rec	Volume (mL)	[IgM] amostra (mg/mL)	IgM total (mg)	% Rec
350-1	35	0,210	7,36	100,0	35	0,212	7,42	100,0
FT-1	31	0,072	2,23	30,3	38	0,042	1,58	21,3
FT-2	45	0,005	0,22	3,0	28	0,027	0,75	10,2
FT-3	-	-	-	-	18	0,000	0,00	0,0
300-1	13	0,197	2,56	34,7	18	0,241	4,35	58,5
300-2	39	0,002	0,09	1,2	-	-	-	-
				<b>69,2</b>				<b>90,0</b>

Fonte: Próprio autor, 2021.

Analisando os géis de poliacrilamida mostrado na figura 22, podemos observar que o perfil de 300-1 em pH 6,0 e 7,0 são semelhantes. No FT-1, o perfil de proteínas também é semelhante.

**Figura 22** – Análise em gel de poliacrilamida a 10%, em condições redutoras das purificações em IMAC-Zn<sup>2+</sup>.



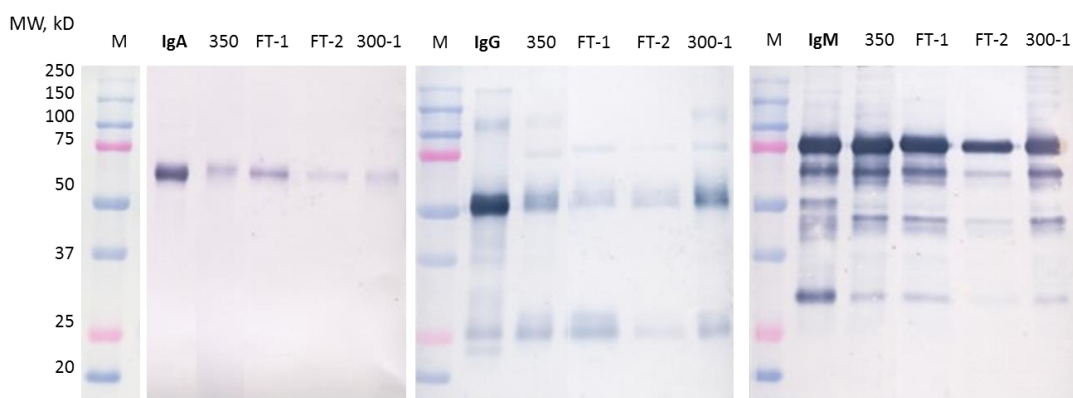
Fonte: Próprio autor, 2021.

M: Padrão de massa molecular; Padrões: IgM (1,9 µg); IgG (2,4 µg); IgA (1,6 µg). **pH 7,0:** 350 (4,8 µg); FT1 (4,3 µg – concentrado 4x); FT2 (3,6 µg – concentrado 9x); 300-1 (5,8 µg); 300-2 (2,9 µg – concentrado 9x); **pH 6,0:** 350 (4,6 µg); FT1 (4,3 µg – concentrado 5x); FT2 (4,4 µg – concentrado 8x); FT-3 (1,26 µg – concentrado 9x); 300-1 (5,6 µg).

O Western Blot foi realizado para detecção das imunoglobulinas presentes nas amostras coletadas nas purificações com zinco. Analisando as membranas mostradas nas figuras 23 e 24, notamos a presença de IgM, IgA e IgG tanto no pH 6,0 quanto no pH 7,0.

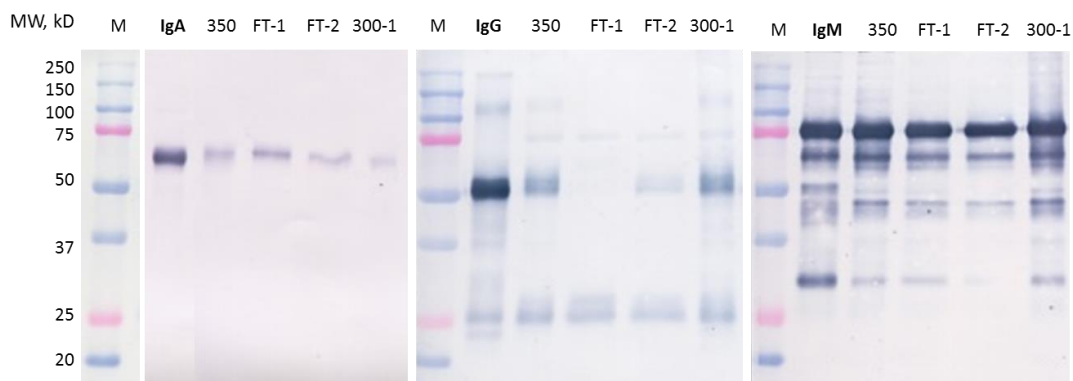
Comparando as purificações realizadas em IMAC-Co<sup>2+</sup> e IMAC-Zn<sup>2+</sup>, os resultados obtidos indicam que IgM adsorve mais fortemente à coluna IMAC-Zn<sup>2+</sup>. Entretanto, a amostra que contém IgM com maior pureza é a FT-1. Portanto, IMAC-Co<sup>2+</sup> é melhor que IMAC-Zn<sup>2+</sup> para a purificação de IgM.

**Figura 23** – Western Blot para a detecção de IgA, IgG e IgM, respectivamente, das frações coletadas na purificação IMAC Zn<sup>2+</sup> pH 7,0.



Fonte: Próprio autor, 2021.

**Figura 24** – Western Blot para a detecção de IgA, IgG e IgM, respectivamente, das frações coletadas na purificação IMAC Zn<sup>2+</sup> pH 6,0.

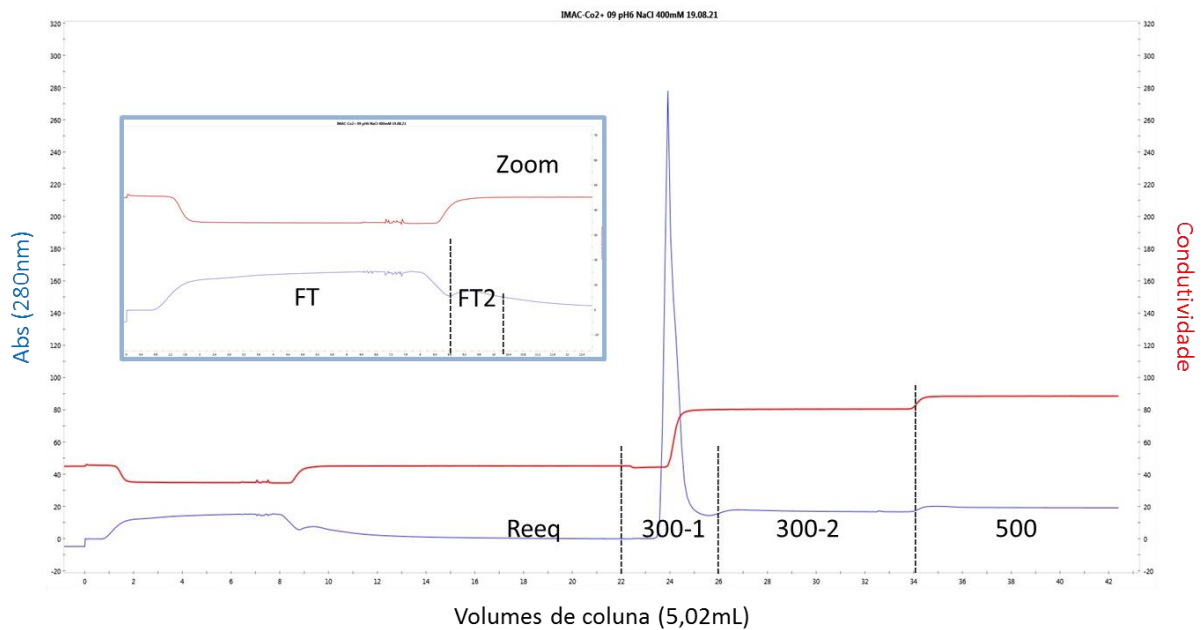


Fonte: Próprio autor, 2021.

#### 4.5 Purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> utilizando diferentes concentrações de NaCl

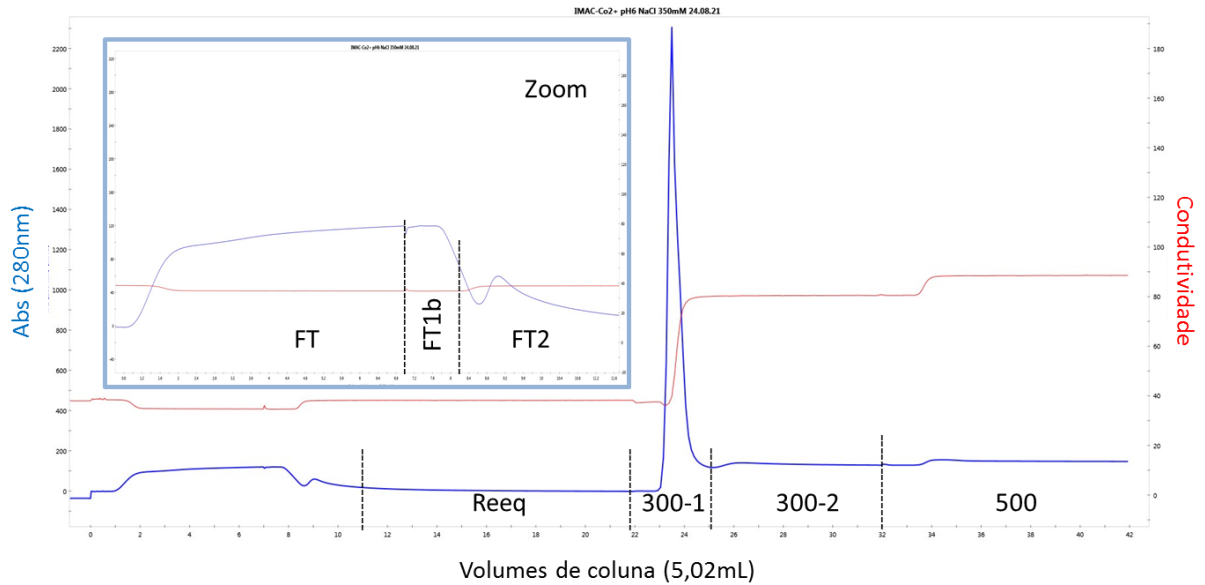
Para aumentar a pureza de IgM em FT1, realizamos um estudo diminuindo a concentração de NaCl do tampão de equilíbrio a fim de que as proteínas presentes em FT2 sejam adsorvidas à coluna com a diminuição da condutividade do tampão de equilíbrio. No estudo da variação de pH em IMAC-Co<sup>2+</sup> a concentração de NaCl no tampão de equilíbrio era 500mM. Realizamos este estudo empregando o tampão de equilíbrio contendo NaCl 400mM, 350mM, 320mM, 300mM e 250mM. As figuras 25, 26, 27, 28 e 29 correspondem aos cromatogramas destas purificações. Os cromatogramas mostram que FT2 diminuiu com a diminuição da concentração de NaCl no tampão de equilíbrio.

**Figura 25** – Cromatograma da purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> em pH 6,0, com tampão de equilíbrio contendo NaCl 400mM. FT-1 e FT2 estão apresentados de forma amplificada.



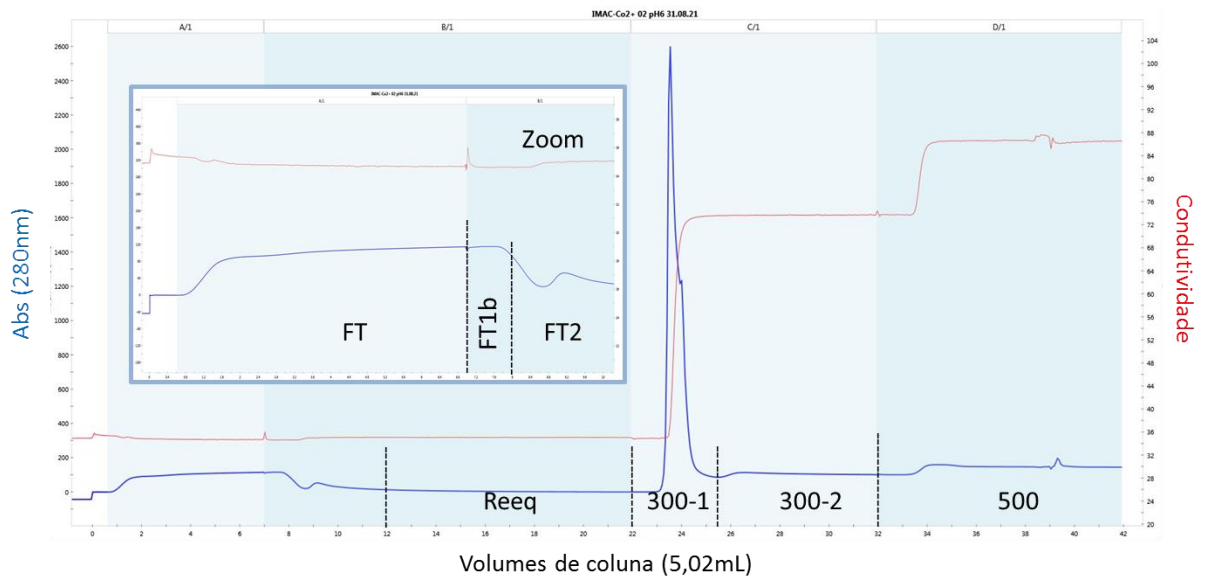
Fonte: Próprio autor, 2021.

**Figura 26** – Cromatograma da purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> em pH 6,0, com tampão de equilíbrio contendo NaCl 350mM. FT-1, FT1b e FT2 estão apresentados de forma amplificada.



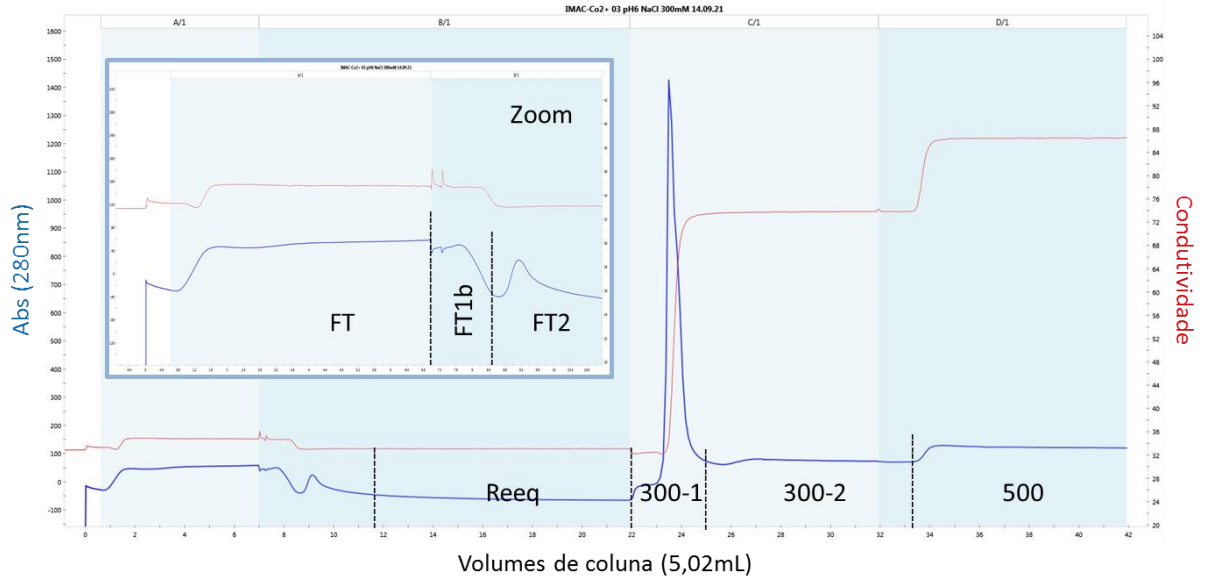
Fonte: Próprio autor, 2021.

**Figura 27** – Cromatograma da purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> em pH 6,0, com tampão de equilíbrio contendo NaCl 320mM. FT-1, FT1b e FT2 estão apresentados de forma amplificada.



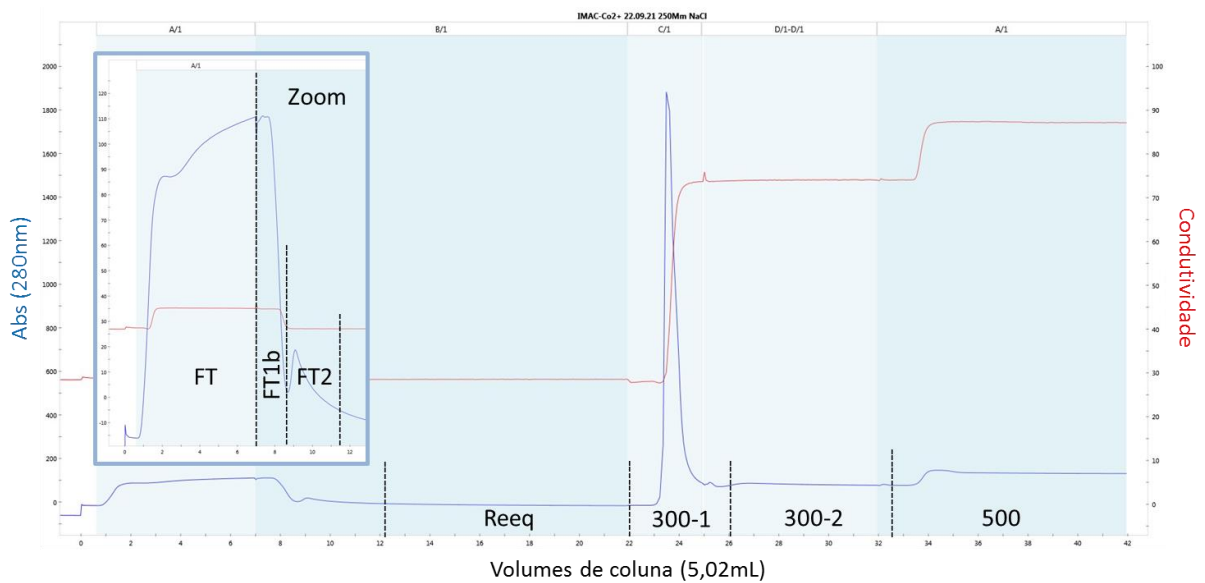
Fonte: Próprio autor, 2021.

**Figura 28** – Cromatograma da purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> em pH 6,0, com tampão de equilíbrio contendo NaCl 300mM. FT-1, FT1b e FT2 estão apresentados de forma amplificada.



Fonte: Próprio autor, 2021.

**Figura 29** – Cromatograma da purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup> em pH 6,0, com tampão de equilíbrio contendo NaCl 250mM. FT-1, FT1b e FT2 estão apresentados de forma amplificada.



Fonte: Próprio autor, 2021.



A dosagem de proteínas pelo método de Bradford não foi realizado para todas as purificações, pois nas concentrações 400mM, 350mM e 320mM, o perfil do cromatograma se mostrou muito semelhante ao cromatograma realizado utilizando 500mM de NaCl. Para as amostras das purificações com NaCl 300mM e 250mM, podemos observar que a recuperação de IgM em FT-1 foram semelhantes, sendo 37,0% e 38,2%, respectivamente. No FT-2, por outro lado, foram recuperados 5,2 % de proteína quando se usou o tampão contendo NaCl 300mM e 1,8 % quando se usou o tampão contendo NaCl 250mM. Podemos observar também que a fração 300-1 do experimento 250mM contém quase o dobro de proteínas que a mesma fração do experimento 300mM.

**Tabela 15** – Proteínas totais obtidas pelo método de Bradford para as frações das purificações em IMAC Co<sup>2+</sup> contendo NaCl 300mM e 250mM no tampão de equilíbrio.

Amostra	300mM NaCl				250mM NaCl			
	Volume (mL)	[prot.] amostra (mg/mL)	Prot ttl (mg)	% Rec	Volume (mL)	[prot.] amostra (mg/mL)	Prot ttl (mg)	% Rec
350-1	35	0,532	18,61	100,0	35	0,421	14,73	100,0
FT-1	33	0,167	5,52	29,7	41	0,137	5,63	38,2
FT-1b	9	0,151	1,36	7,3				
FT-2	16	0,061	0,97	5,2	15	0,018	0,27	1,8
300-1	16	0,330	5,28	28,4	21	0,363	7,62	51,7
300-2	35	0	0	0	32	-0,020	0,00	0,0
				<b>70,6</b>				<b>91,7</b>

**Fonte:** Próprio autor, 2021.

Testes turbidimétricos também foram realizados em busca das imunoglobulinas IgA, IgG e IgM, nos experimentos em que o tampão de equilíbrio continha NaCl 320mM, 300mM e 250mM. Podemos observar que a recuperação de IgM no FT-1 foi entre 55% e 66% e em FT-2 foi abaixo da faixa de detecção em 320mM e 300mM e 3,2% em 250mM (tabela 16)

Não foi detectada a presença de IgG nas frações coletadas nas purificações.

**Tabela 16** – Dosagem de IgM das frações das purificações em IMAC Co<sup>2+</sup> com tampões de equilíbrio contendo diferentes concentrações de NaCl.

Amostra	320mM NaCl				300mM NaCl				250mM NaCl			
	Volume (mL)	Conc IgM (mg/mL)	IgM total (mg)	% Rec	Volume (mL)	Conc IgM (mg/mL)	IgM total (mg)	% Rec	Volume (mL)	Conc IgM (mg/mL)	IgM total (mg)	% Rec
350-1	35	0,253	8,84	100,0	35	0,237	8,28	100,0	35	0,331	11,58	100,0
FT-1	33	0,138	4,56	51,6	33	0,107	3,54	42,7	41	0,151	6,18	53,4
FT-1b	10	0,130	1,30	14,8	9	0,116	1,04	12,6				
FT-2	18	-0,003	0,00	0,0	16	0,007	0,00	0,0	15	0,012	0,18	1,6
Reeq.	-	-	-	-	55	0,000	0,00	0,0	54	0,007	0,37	3,2
300-1	19	0,136	2,58	29,2	16	0,071	1,14	13,7	21	0,162	3,41	29,5
300-2	33	0,000	0,00	0,0	35	0,000	0,00	0,0	32	0,017	0,53	4,6
500	-	-	-	-	53	0,000	0,00	0,0	54	0,007	0,37	3,2
				<b>95,5</b>				<b>69,0</b>				<b>95,4</b>

Fonte: Próprio autor, 2021.

**Tabela 17** – Concentração de IgA e IgA totais obtidos em imunoturbidimetria para as frações das purificações em IMAC Co<sup>2+</sup> em diferentes concentrações de NaCl.

Amostra	320mM NaCl				300mM NaCl				250mM NaCl			
	Volume (mL)	Conc IgA (mg/mL)	IgA total (mg)	% Rec	Volume (mL)	Conc IgA (mg/mL)	IgA total (mg)	% Rec	Volume (mL)	Conc IgA (mg/mL)	IgA total (mg)	% Rec
350-1	35	0,177	6,19	100,0	35	0,080	2,81	100,0	35	0,159	5,56	100,0
FT-1	33	0,047	1,55	25,1	33	0,032	1,06	37,6	41	0,026	1,06	19,0
FT-1b	10	0,015	0,15	2,5	9	-	-	-				
FT-2	18	0,000	0,00	0,0	16	0,058	0,92	32,8	15	-	-	0,0
Reeq.	-	-	-	-	55	0,000	0,00	0,0	54	-	-	0,0
300-1	19	0,029	0,54	8,8	16	0,037	0,59	20,8	21	0,086	1,80	32,3
300-2	33	0,008	0,26	4,2	35	0,000	0,00	0,0	32	-	-	0,0
500	-	-	-	-	-	-	-	-	54	-	-	0,0
				<b>40,6</b>				<b>91,2</b>				<b>51,3</b>

Fonte: Próprio autor, 2021.

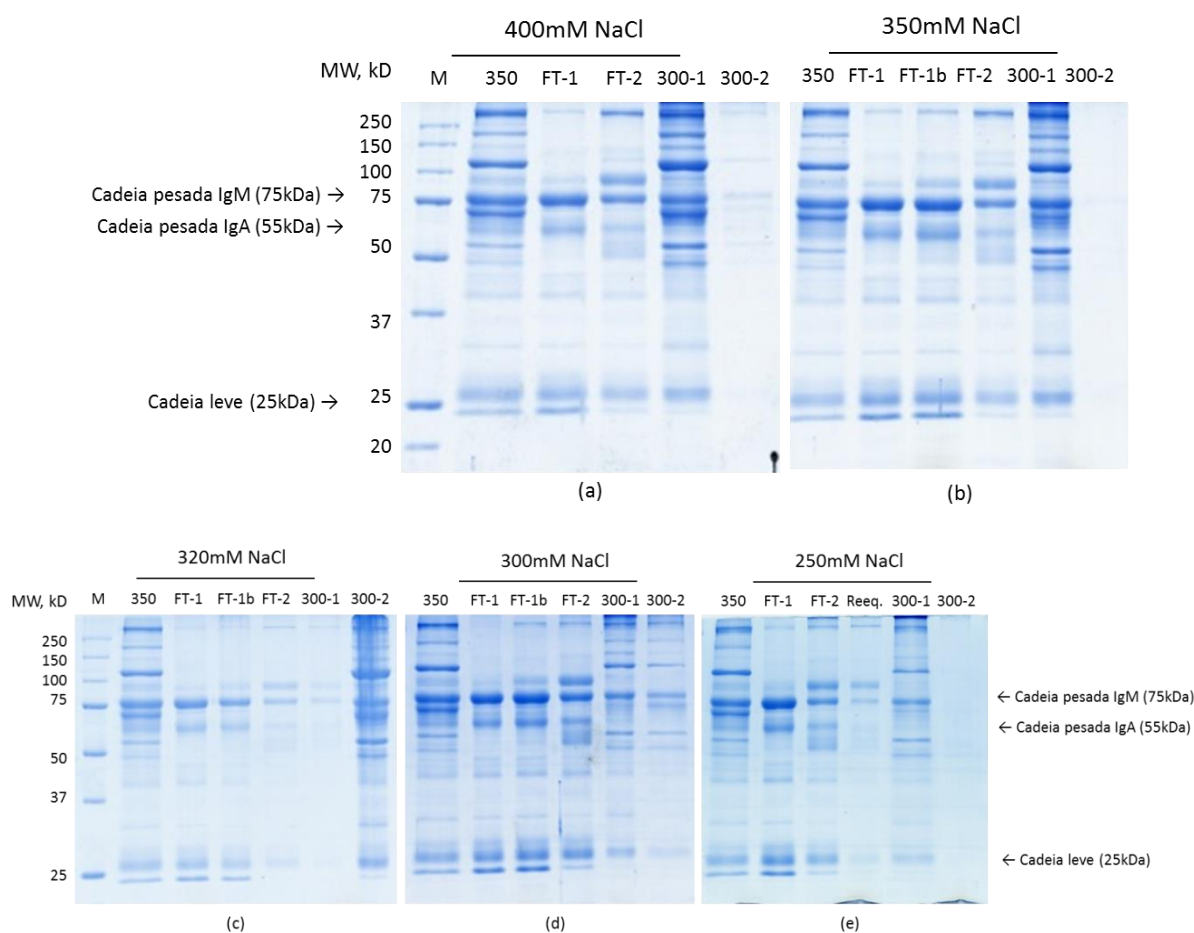
Analisando os géis de poliácridamida, podemos observar que o perfil do FT-1 do 250mM é semelhante aos outros FT-1 das outras purificações.

A banda acima da cadeia pesada de IgM e as de massa molecular maior que 250 kDa parecem ser mais intensas em FT-2.do que em FT-1.

Embora não tenha sido possível quantificar a purificação de IgM com a diminuição da concentração de NaCl no tampão de equilíbrio, foi possível observar no cromatograma a diminuição do pico em FT-2 com a diminuição da concentração deste sal no tampão e a presença de proteínas contaminantes de alta massa

molecular presentes em FT-2, que estão em concentração menor em FT-1 em comparação com a banda da cadeia pesada de IgM.

**Figura 30** – Análise em gel de poliacrilamida a 10%, em condições redutoras das purificações em IMAC-Co<sup>2+</sup> pH 6,0 com diferentes concentrações de NaCl.



**Fonte:** Próprio autor, 2021.

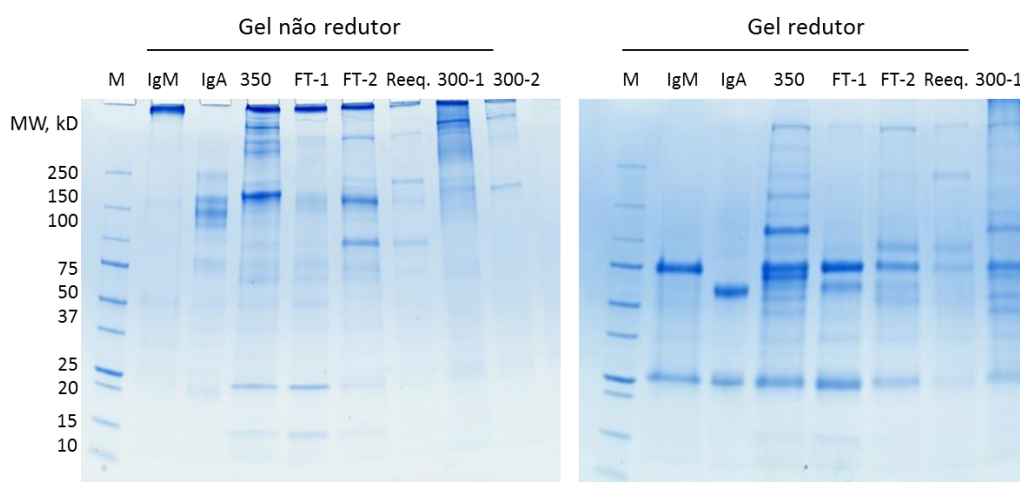
M: Padrão de massa molecular; Padrões: IgM (1,9 µg); IgG (2,4 µg); IgA (1,6 µg). **400mM, 350mM e 320mM NaCl** (consideradas as concentrações da IMAC-Co<sup>2+</sup> pH6): 350 (4,6 µg); FT1 (4,9 µg – concentrado 3x); FT2 (5,6 µg – concentrado 7x); 300-1 (5,4 µg – concentrado 2x); 300-2 (8,3 µg – concentrado 2x). **300mM NaCl:** 350 (6,38 µg); FT1 (6,03 µg – concentrado 3x); FT-1b (5,43 µg – concentrado 3x); FT2 (5,12 µg – concentrado 7x); 300-1 (7,92 µg – concentrado 2x); 300-2 (0,52 µg – concentrado 9x). **250mM NaCl:** 350 (5,05 µg); FT1 (4,94 µg – concentrado 3x); FT2 (1,91 µg – concentrado 9x); Reeq. (1,48 µg – concentrado 9x); 300-1 (4,35 µg); 300-2 (0,13 µg – concentrado 9x).

Dando continuidade aos experimentos, foi utilizado um gel gradiente 4-20% pronto para uso da Bio-Rad (TGX Bio-Rad Laboratories, Singapura), com o intuito de analisar a pureza do FT-1 proveniente da purificação com 250mM de NaCl. Nossas amostras foram preparadas de duas formas: a primeira foi de forma redutora,

utilizando o  $\beta$ -mercaptoetanol em nosso tampão de amostra 5x. A segunda forma foi de forma não redutora, utilizando tampão de amostra 5x sem a presença de  $\beta$ -mercaptoetanol.

Observamos na figura 31, que no gel redutor, o FT-1 é composto basicamente por IgM e IgA, possuindo poucos contaminantes. No gel não redutor, entretanto, é possível observar que além de IgM, que não entra no gel e IgA, que tem 160 kDa, tem uma banda de 20 kDa e uma de 15 kDa e outras bandas de intensidade menor.

**Figura 31** – Análise dos géis de poliacrilamida com gradiente 4-20% redutor e não redutor da purificação da IMAC- $\text{Co}^{2+}$  contendo NaCl 250mM.

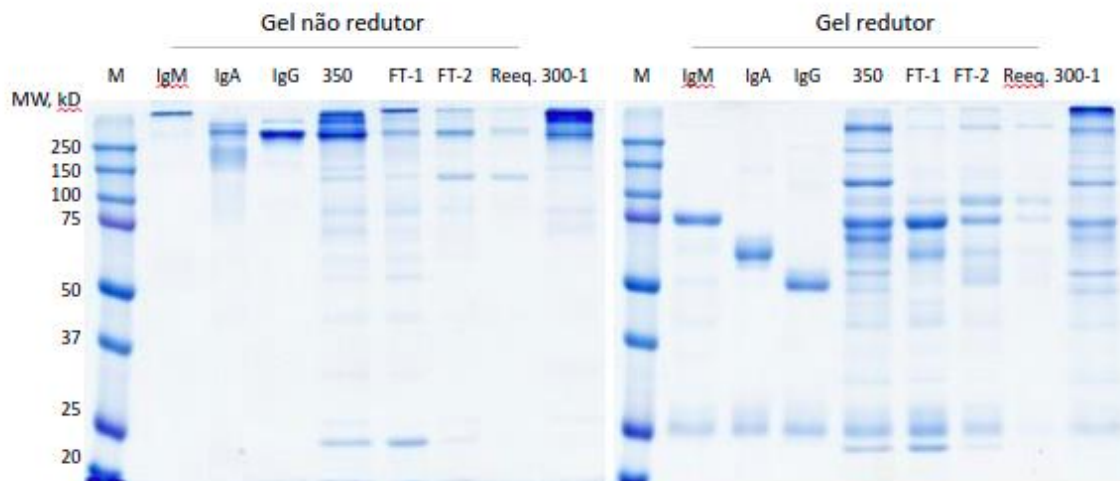


**Fonte:** Próprio autor, 2021.

M: Padrão de massa molecular; **Gel não redutor:** Padrão IgM (1,92  $\mu\text{g}$ ); Padrão IgA (1,60  $\mu\text{g}$ ); 350 (5,05  $\mu\text{g}$ ); FT1 (4,94  $\mu\text{g}$  – concentrado 3x); FT2 (1,91  $\mu\text{g}$  – concentrado 9x); Reeq. (1,48  $\mu\text{g}$  – concentrado 9x); 300-1 (4,35  $\mu\text{g}$ ); 300-2 (0,13  $\mu\text{g}$  – concentrado 9x). **Gel redutor:** Padrão IgM (1,92  $\mu\text{g}$ ); Padrão IgA (1,60  $\mu\text{g}$ ); 350 (5,05  $\mu\text{g}$ ); FT1 (4,94  $\mu\text{g}$  – concentrado 3x); FT2 (1,91  $\mu\text{g}$  – concentrado 9x); Reeq. (1,48  $\mu\text{g}$  – concentrado 9x); 300-1 (4,35  $\mu\text{g}$ ).

A figura 32 mostra os géis de poliacrilamida 10 % redutor e não redutor da purificação em IMAC- $\text{Co}^{2+}$  com tampão de equilíbrio contendo NaCl 250mM. Observamos no gel não redutor uma banda de massa 25kDa, que parece ser a banda logo abaixo da cadeia leve das imunoglobulinas no gel redutor, presente em 350 e em FT-1. Esta banda pode ser a banda de 20kDa observada no gel em gradiente.

**Figura 32** – Análise dos géis de poliacrilamida 10% com amostras redutoras e não redutoras advindas da purificação IMAC- $\text{Co}^{2+}$  contendo NaCl 250mM.

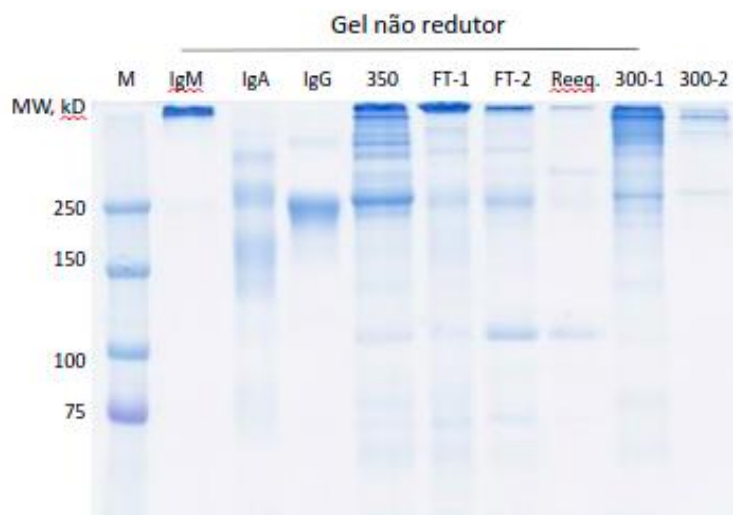


**Fonte:** Próprio autor, 2021.

**M:** Padrão de massa molecular; **Gel não redutor:** Padrão IgM (1,92  $\mu\text{g}$ ); Padrão IgA (1,60  $\mu\text{g}$ ); 350 (5,05  $\mu\text{g}$ ); FT1 (4,94  $\mu\text{g}$ ); FT2 (1,91  $\mu\text{g}$ ); Reeq. (1,48  $\mu\text{g}$ ); 300-1 (4,35  $\mu\text{g}$ ); 300-2 (0,13  $\mu\text{g}$ ). **Gel redutor:** Padrão IgM (1,92  $\mu\text{g}$ ); Padrão IgA (1,60  $\mu\text{g}$ ); 350 (5,05  $\mu\text{g}$ ); FT1 (4,94  $\mu\text{g}$ ); FT2 (1,91  $\mu\text{g}$ ); Reeq. (1,48  $\mu\text{g}$ ); 300-1 (4,35  $\mu\text{g}$ ).

Numa tentativa para ver a banda de IgM dentro do gel, realizamos uma análise em gel não redutor 7,5% em que a corrida foi acompanhada pela posição da banda de 75 kDa, empregando o padrão dual color da BioRad, porque neste padrão as bandas são visíveis durante a corrida e a banda de 75 kDa tem coloração rosa (figura 33). Mesmo com a banda de 75 kDa no final do gel, a banda de IgM não entrou.

**Figura 33** – Análise dos géis de poliacrilamida 7,5% com amostras não redutoras advindas da purificação IMAC-Co<sup>2+</sup> contendo NaCl 250mM.



**Fonte:** Próprio autor, 2021.

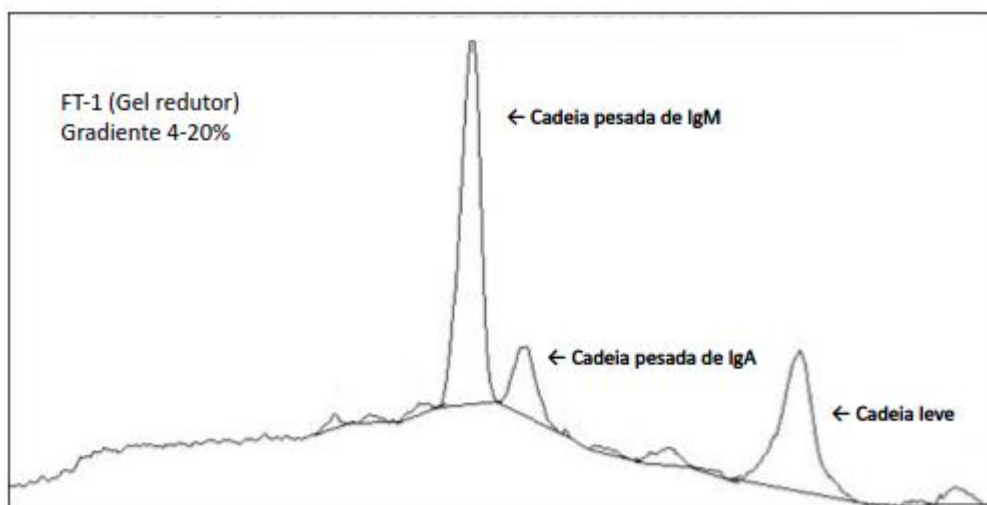
M: Padrão de massa molecular; Padrão IgM (1,92 µg); Padrão IgA (1,60 µg); Padrão IgG (2,4 µg); 350 (5,05 µg); FT1 (4,94 µg – concentrado 3x); FT2 (1,91 µg – concentrado 9x); Reeq. (1,48 µg – concentrado 9x); 300-1 (4,35 µg); 300-2 (0,13 µg – concentrado 9x).

Para quantificarmos a pureza de IgM, utilizamos o gel gradiente 4-20% no ImageJ, programa desenvolvido pelo National Institutes of Health.

A presença de pequenos picos no nosso FT-1 é observável, contudo, os picos referentes às cadeias pesadas e a cadeia leve das imunoglobulinas se destacam dos outros picos presentes. Segundo nossas análises, alguns picos poderiam ser desconsiderados levando em consideração os picos referentes aos padrões IgM e IgA, que segundo o fabricante apresentam pureza acima de 95%.

Sabendo-se disso, fizemos os cálculos referentes aos picos considerados, e concluímos que o nosso FT-1 apresentou aproximadamente 90,5% de pureza, sendo pouco mais de 48% e 10% referentes as cadeias pesadas de IgM e IgA respectivamente, e pouco mais de 31% correspondente a cadeia leve de ambas as imunoglobulinas. Dentre a porcentagem da pureza do FT-1, observamos aproximadamente 75% de pureza de IgM.

**Figura 34** – Análise do ImageJ do FT-1 em condições redutoras advindo da purificação IMAC-Co<sup>2+</sup> contendo NaCl 250mM, em gel gradiente 4-20%.



Fonte: Próprio autor, 2021.

**Tabela 18** – Porcentagem de IgM e IgA presentes no FT-1 em condições redutoras advindo da IMAC-Co<sup>2+</sup> contendo 250mM de NaCl em gel gradiente 4-20%, adquiridas pelo ImageJ.

Cadeias	Tamanho da área (ImageJ)	% da área	Quant. proteína aplicada (%)	Pureza (%)
Cadeia pesada IgM	3.912.698	48,44	0,7976	<b>90,22</b>
Cadeia pesada IgA	841.770	10,42	0,1716	
Cadeia leve	2.533.397	31,36	0,5164	

Fonte: Próprio autor, 2021.

**Proporção da cadeia leve:** IgM apresenta 5 vezes mais cadeias leves do que IgA.

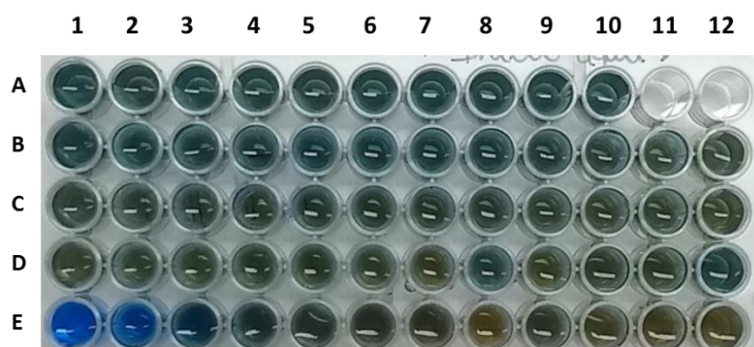
#### 4.6 Purificação do eluato da ANX Sepharose FF (fração 350) em HiTrap-SP

A purificação foi realizada com o auxílio de uma bomba peristáltica com fluxo ajustado para 1mL/min.

Por ter sido coletado em tampão Tris-HCl contendo NaCl 350mM, a amostra foi diluída 10 vezes em água purificada com o intuito da diluição do sal, para que a

amostra pudesse ser adsorvida à coluna. Amostras de 1mL foram coletadas e analisadas com a reagente de Bradford a fim de determinar as amostras que continham proteínas.

**Figura 35** – Método de Bradford em microplaca com amostras da purificação de troca catiônica.



**Fonte:** Próprio autor, 2021.

**Alíquotas:** FT (A1 até A10); Reequilíbrio 1 (B1 até C1); Reeq. 2 (C2 até C6); 500mM (D10 até E4).

Os resultados obtidos da dosagem de proteínas pelo método de Bradford encontram-se na tabela 19, onde podemos observar as proteínas não foram retidas na coluna, saindo em maior quantidade no FT.

**Tabela 19** – Valores obtidos no método de Bradford em diferentes faixas de detecção após purificação em coluna de troca catiônica.

Amostra	Volume (mL)	[prot.] amostra (ug/mL)	Prot ttl (ug)	Prot ttl (mg)	Amostra	Volume (mL)	[prot.] amostra (mg/mL)	Prot ttl (mg)
FT-1	73,9	38,83	2869,78	2,87	350	73,9	0,54	3,96
Reeq. 1	6,9	10,38	71,63	0,071	500	8,1	0,12	0,95

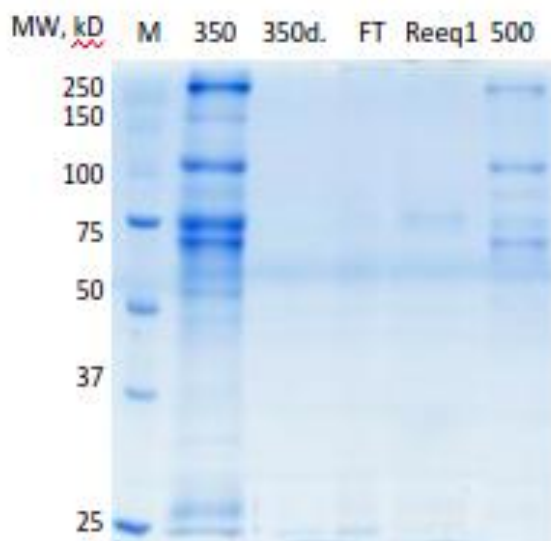
**Fonte:** Próprio autor, 2021.

O gel de poliacrilamida mostrado na figura 36 mostra que, nota-se que apenas a amostra de entrada não diluída e a fração 500 apresentam bandas. Apesar



da detecção de proteínas por Bradford, a fração FT não apresentou bandas. Uma banda fraca em Reeq1 sugere que esta seja a banda da cadeia pesada de IgM.

**Figura 36** – Análise em gel de poliacrilamida a 10%, em condições redutoras da primeira purificação em HiTrap-SP.

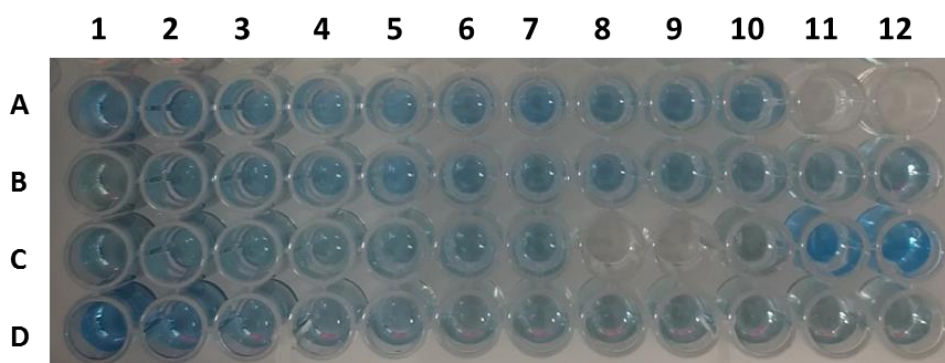


**Fonte:** Próprio autor, 2021.

M: Padrão de massa molecular; 350 (6,44  $\mu\text{g}$ ); 350d. (-0,81 $\mu\text{g}$  – concentrado 10x); FT (-0,18  $\mu\text{g}$  – concentrado 10x); Reeq. 1 (-1,29  $\mu\text{g}$  – concentrado 10x); 500 (1,41  $\mu\text{g}$ ).

Foi realizada uma repetição do experimento, mas o acompanhamento foi realizado por Bradford usando um protocolo mais sensível que o anterior, denominado microensaio.

**Figura 37** – Método de Bradford em microplaca com amostras do segundo experimento em HiTrap-SP.



**Fonte:** Próprio autor, 2021.

**Alíquotas:** FT (A1 até A10); Reequilíbrio (B1 até C6); 500mM-1 (C11 até D2); 500mM-2 (D3 até D8).

Devido à diluição da amostra de entrada, utilizamos o protocolo denominado de microensaio da dosagem de Bradford para determinação de proteínas presentes em nossas frações. Observamos que temos uma maior quantidade de proteínas no FT do que em outras frações, conforme mostrado na tabela 20.

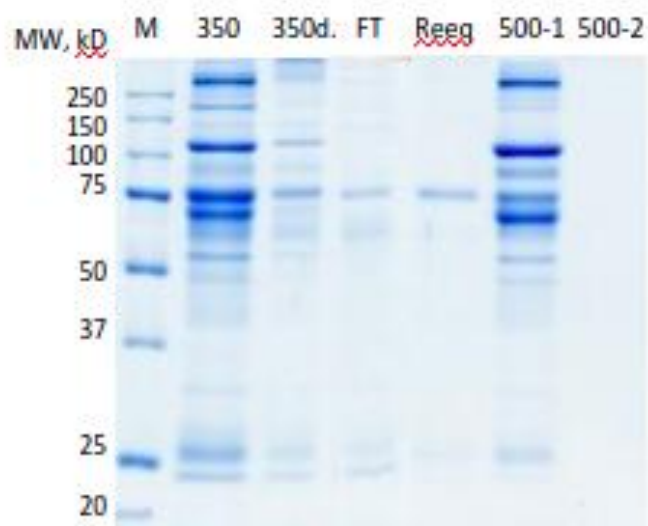
**Tabela 20** – Valores obtidos no método de Bradford – microensaio na segunda purificação em coluna de troca catiônica HiTrap SP.

Amostra	Volume (mL)	[prot.] amostra (ug/mL)	Prot ttl (ug)	Prot ttl (mg)	% Rec
350	70	<b>64,0</b>	<b>4476,7</b>	4,48	100
FT	70	<b>36,8</b>	<b>2576,7</b>	2,58	57,59
Reeq	10	<b>22,0</b>	<b>220,5</b>	0,22	4,91
500-1	2	<b>147,4</b>	<b>294,9</b>	0,29	6,47
500-2	8	<b>5,5</b>	<b>44,0</b>	0,004	0,09

Fonte: Próprio autor, 2021.

O gel de poliacrilamida apresentado na figura 38 mostra que no FT é possível observar as bandas das cadeias pesadas de IgM e IgA, assim como a banda da cadeia leve e a banda da proteína contaminante logo abaixo dela. Estas bandas também podem ser observadas na purificação em IMAC-Co<sup>2+</sup>. Para que os resultados desta purificação possam ser melhor avaliados, será necessário concentrar as amostras aplicadas no gel.

**Figura 38** – Análise em gel de poliacrilamida a 10%, em condições redutoras do segundo experimento em HiTrap-SP.



**Fonte:** Próprio autor, 2021.

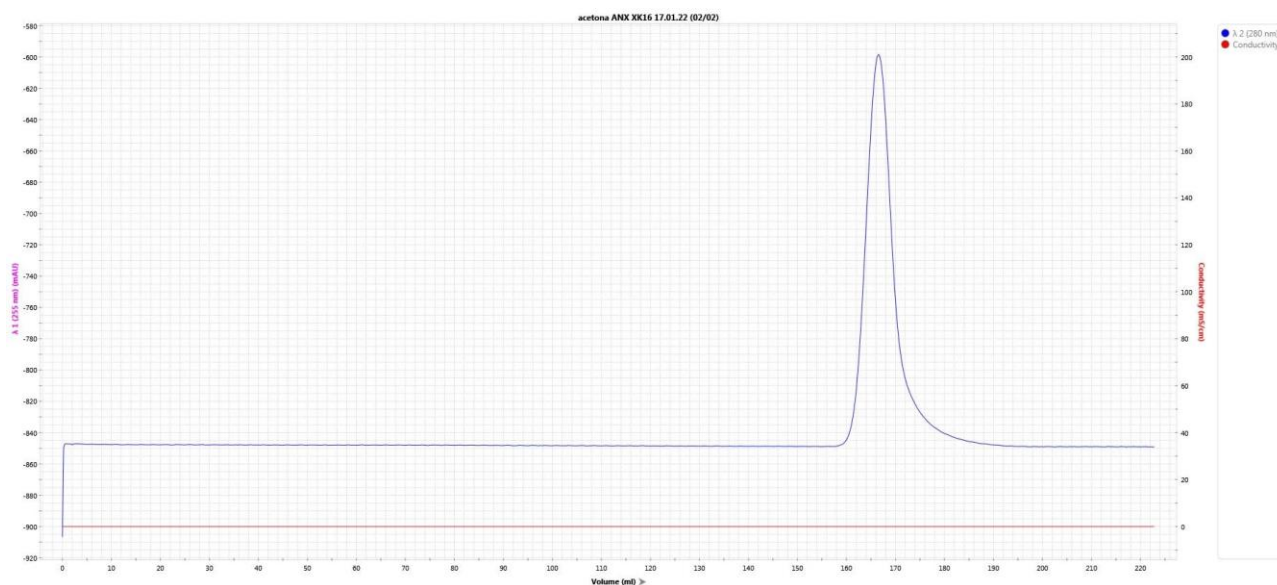
**M:** Padrão de massa molecular; 350 (4,69 µg); 350d. (4,57 µg – concentrado 6x); FT (4,32 µg – concentrado 10x); Reeq. 1 (0,64 µg); 500-1 (3,53 µg – concentrado 2x); 500-2 (0,60 µg – concentrado 10x).

#### 4.7 Purificação do FT1 da IMAC-Co<sup>2+</sup> pH 6,0 em Superdex 200

Após observarmos a presença de IgM em nosso pool A65-72 denominado de 500, advindo da concentração do FT1 advindo da IMAC-Co<sup>2+</sup> pH 6,0 contendo NaCl 250mM em ANX-Sepharose FF, prosseguimos com os experimentos utilizando essa fração para uma purificação em coluna XK16 empacotada com Superdex 200. Antes de utilizarmos a coluna, um teste de eficiência do empacotamento foi realizado, aplicando acetona a 1%.

Os resultados obtidos foram: Altura de um prato teórico (HEPT) =  $2,10 \times 10^{-4}$ ; Número de pratos teóricos (N) = 4266,14; Número de pratos teóricos por metro de resina (N/m) = 4,740; Fator de assimetria da coluna (As) = 1,428.

**Figura 39** – Teste de eficiência do empacotamento utilizando acetona a 1% em coluna XK16 empacotada com Superdex 200.

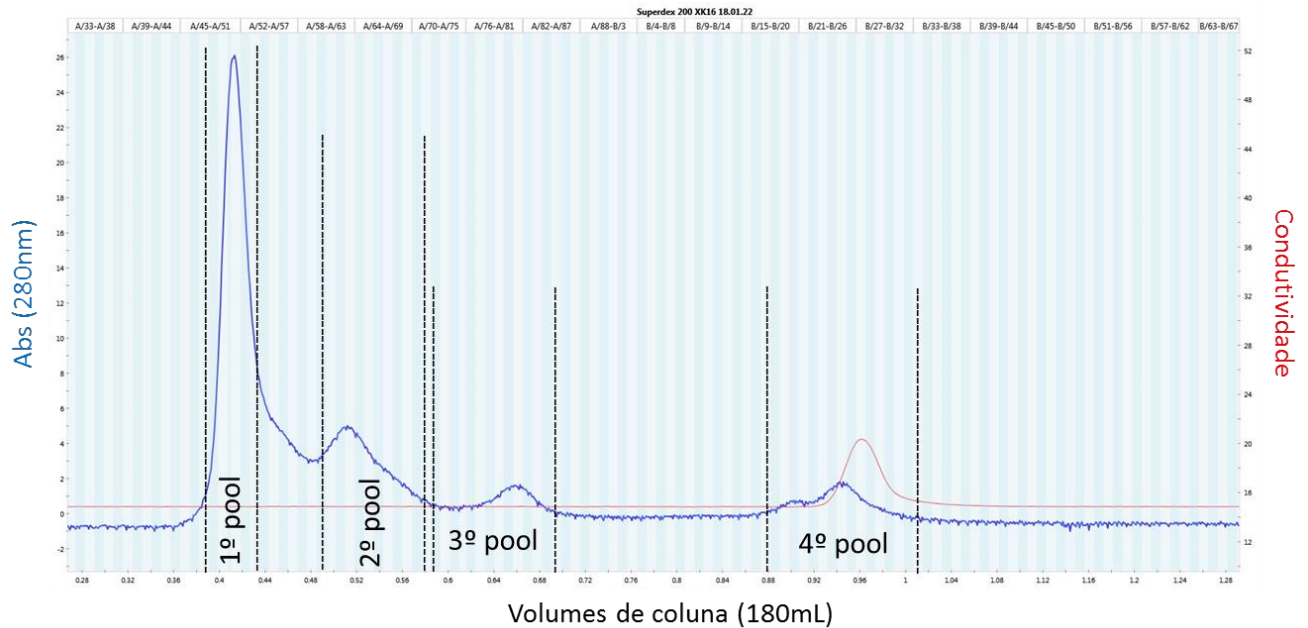


**Fonte:** Próprio autor, 2021.

Utilizamos a cromatografia por exclusão molecular com o intuito de separarmos nosso IgM de outras proteínas, dentre elas, a IgA, pois devido ao seu tamanho, IgM eluiria com o solvente.

Assim como na concentração, as amostras foram coletadas em frações de 1,0mL para que a diluição do IgM fosse a menor possível quando houvesse a formação dos pools. Na figura 40, podemos observar as delimitações dos picos adquiridos em nossa purificação.

**Figura 40** – Cromatograma da purificação em Superdex 200, utilizando a fração 500 da concentração em ANX Sepharose FF.

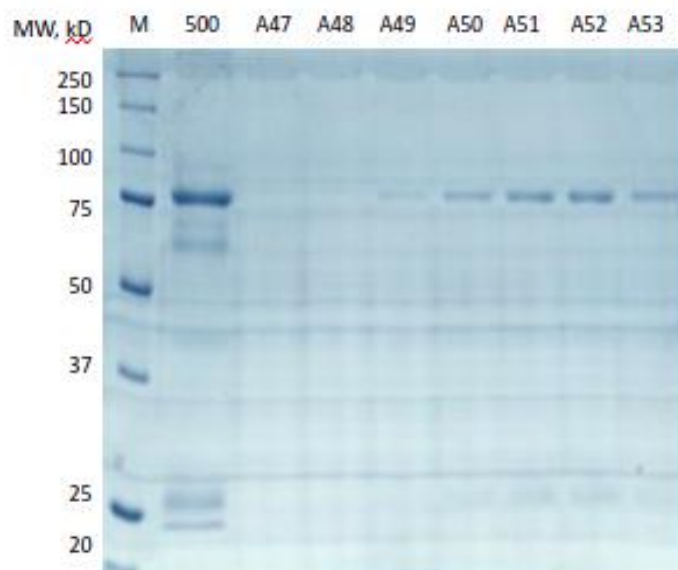


**Fonte:** Próprio autor, 2021.

1º pool: A47-53; A54-56; A57-59; 2º pool: A60-71; 3º pool: A72-85; 4º pool: B17-35.

A análise em gel de poliácridamida dos tubos 47 até a A53 (figura 41) mostram a cadeia pesada de IgM, indicando que a IgM eluiu no primeiro pico da purificação.

**Figura 41** – Análise do gel de poliácridamida 10% em condições redutoras das frações A47 a A53 da purificação em Superdex 200.



**Fonte:** Próprio autor, 2021.  
M: Padrão de massa molecular;

A análise dos pools das frações está em andamento.

## 5 DISCUSSÃO

Desde a década de 1970, muitos trabalhos são encontrados na literatura sobre a purificação da imunoglobulina IgM, como o trabalho descrito em 1975 por Pattison e Mace. Em geral, a imunoglobulina M é citada nos processos de produção de IgG (TANAKA, 2000; WU *et al.*, 2014; HOSSEINI; GHASEMZADEH, 2016).

Segundo estudos já realizados em nosso laboratório, a separação de imunoglobulinas pode ser realizada a partir da utilização de gel filtração do plasma, seguida por uma coluna de troca iônica. Neste trabalho, utilizamos o eluato da purificação em troca iônica e aplicamos em colunas de afinidade com diferentes metais imobilizados.

A utilização dessa técnica cromatográfica descrita por Porath e seus colaboradores é vista pela literatura como uma das formas de purificação de proteínas plasmáticas (SULKOWSKI, 1985; VANÇAN; MIRANDA; BUENO, 2002). Em nosso estudo, utilizamos IMAC-Co<sup>2+</sup>.

Observamos que nos pHs 5,0, 6,0 e 7,0, parte de IgM se liga a coluna e parte não se liga.

A utilização do zinco como metal imobilizado na coluna também foi testada. Observamos que assim como os resultados obtidos com cobalto, IgM está presente em todas as frações coletadas. Comparando a imobilização destes dois metais, foi possível observar que o cobalto apresentou melhores resultados do que o zinco.

Dando continuidade aos nossos resultados, utilizando pH 6,0, decidimos modificar a concentração de sal do tampão de equilíbrio para a melhor separação de IgM de proteínas presentes em FT-2. A IgM e IgA eluíram juntas em todas as condições experimentais de concentração de sal, porém observamos que na presença de NaCl 250mM, o pico FT-2 apresentava-se menor do que nas outras purificações.

Seguindo com os experimentos, aplicamos a FT-1 da IMAC-Co<sup>2+</sup>, concentrada em ANX Sepharose FF em coluna de gel filtração Superdex 200, com o intuito de separarmos IgM de outras proteínas, dentre elas a IgA, seguindo o princípio de que moléculas menores ficam retidas nos poros da resina, enquanto moléculas maiores passam rapidamente pelo interior da coluna (HELMUD, 1969). Devido a diluição da nossa amostra, apenas conseguimos observar as bandas correspondentes à IgM, conforme a figura 37, contudo, acreditamos que a

separação de IgM de outras proteínas por gel filtração foi bem sucedida, pois a IgM apresenta cerca de 970 kDa, enquanto que IgA apresenta 160 kDa.

Foi avaliado também a purificação de “350”, eluato da purificação em ANX Sepharose FF, em uma coluna de troca catiônica HiTrap diluída 10 vezes em água purificada. Nas condições experimentais empregadas, IgM eluiu no FT. Como as amostras desta fração estavam muito diluídas, não foi possível avaliar ainda o resultado desta purificação.



## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, explorou-se a terceira etapa de purificação para obtenção da imunoglobulina M dando continuidade aos estudos anteriores desenvolvidos pelo laboratório.

Com base nos resultados apresentados, podemos concluir que a melhor estratégia de purificação foi em IMAC-Co<sup>2+</sup> em pH 6,0 com solução de equilíbrio da coluna contendo NaCl 250mM.

Na purificação em coluna de gel filtração Superdex 200 o cromatograma obtido indica que foi possível separar IgM de proteínas de menor massa molecular, mas os resultados ainda estão em análise.

Nossos resultados indicam que a IgM foi obtida neste trabalho com maior pureza do que tínhamos em trabalhos anteriores. Obtivemos um produto com um bom grau de pureza (aproximadamente 70%).

REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- AMORIM FILHO, L. M. Cenário mundial do fracionamento industrial de plasma e da produção de hemoderivados. **Divulgação em saúde para debate**, Rio de Janeiro, n. 50, p. 93-101, nov. 2013.
- BLOCK, H.; MAERTENS, B.; SPRIESTERBACH, A.; BRINKER, N.; KUBICEK, J.; FABIS, R.; LABAHN, J.; SCHÄFER, F. Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC). Chapter 27. **Guide to Protein Purification**, 2nd Edition, p. 439–473, 2007. doi:10.1016/s0076-6879(09)63027-5
- BRADLEY, J. Immunoglobulins. **Journal of Medical Genetics**, v. 11, n.1, p. 80–90, 1974. doi:10.1136/jmg.11.1.80
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Caderno de informação: Sangue e Hemoderivados. **Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática**. – Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 118 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Guia para uso de hemocomponentes. **Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática**. – 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 136 p.
- BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidades por metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1288-1296, 2009. doi:10.1590/s0100-40422009000500035
- BURNOUF, T. Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 664, n. 1, p. 3–15, 1995. doi:10.1016/0378-4347(94)00532-a
- BURNOUF, T. Modern plasma fractionation. **Transfus. Med. Rev.**, v. 21, p. 101-17, 2007. doi: 10.1016/j.tmr.2006.11.001.
- CEPPELLINI R.; DRAY, S.; EDELMAN, G.; FAHEY J.; FRANEK F.; FRANKLIN, E. Nomenclature for human immunoglobulin. **Bull World Health Org.**, v. 30, p. 447–450, 1964.
- CGEE. Hemoderivados. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Ciência, Tecnologia e Inovação**. Rio de Janeiro. Março. 2006. Disponível em: <[https://www.redetec.org.br/wpcontent/uploads/2015/02/tr07\\_hemoderivados.pdf](https://www.redetec.org.br/wpcontent/uploads/2015/02/tr07_hemoderivados.pdf)>. Acesso em 11/2021.

---

<sup>1</sup> ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

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

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia. **Editora da Unicamp**, Janeiro de 2006, 456 p.

COSKUN, O. Separation techniques: Chromatography. **North Clin Istanb.** v. 3, n. 2, p. 156-160, 2016. doi:10.14744/nci.2016.32757

COVAS, D. T. Hemoderivados no Brasil. **Anexo 1**, 2014. 22p. Disponível em: <[https://www.al.sp.gov.br/spl/2017/07/Acessorio/1000050996\\_1000084539\\_Acessorio.pdf](https://www.al.sp.gov.br/spl/2017/07/Acessorio/1000050996_1000084539_Acessorio.pdf)> Acesso em: 11/2021.

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

FARRUGIA, A.; PENROD, J.; BULT, J. M. Payment, compensation and replacement - the ethics and motivation of blood and plasma donation. **Vox Sanguinis**, v. 99, n. 3, p. 202–211, 2010. doi:10.1111/j.1423-0410.2010.01360.x

FARRUGIA, A.; CASSAR, J. Plasma-derived medicines: access and usage issues. **Blood Transfus.**, v. 10, p. 273-278, 2012. doi:10.2450/2011.0118-11

FONSÊCA, F. P. B. **Avaliação do uso de imunoglobulina poliespecíficas em um hospital geral**. 2014. 78f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Recife, 2014.

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

HEARON, J. The configuration of cobalthistidine and oxy-bis (cobalthistidine). **J. Natl. Cancer Inst.** v. 9, p. 1–11, 1948. <https://doi.org/10.1093/jnci/9.1.1>

HELMUT D. Gel Chromatography, gel filtration, gel permeation, molecular sieves: a laboratory hand book. **Springer-Verlag**; 1969.

HOSSEINI, K. M.; GHASEMZADEH, M. Implementation of Plasma Fractionation in Biological Medicines Production. **Iran J Biotechnol**, v. 14, n. 4, p. 213–220. Dec. 2016. doi:10.15171/ijb.1401

IWASHITA, C. **Desenvolvimento de duas estratégias de purificação de IgM a partir de plasma humano**. 2016. 158f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

JUNQUEIRA, P. C; ROSENBLIT, J.; HAMERSCHLAK, N. História da Hemoterapia no Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 27. Set. 2005. doi:10.1590/S1516-84842005000300013

KABAT, E. A. The molecular weight of antibodies. **J. Exp. Med.**, v. 69, n. 1, p. 103-118. 1939. doi:10.1084/jem.69.1.103.

KARLSSON, E.; RYDEN, L.; BREWER, J. Protein purification. Principles, High Resolution Methods, and Applications. Ion exchange chromatography. **Wiley-VCH**, 2nd ed. New York: Wiley; 1998.

KAVERI, S. V.; SILVERMAN, G. J.; BAYRY, G. J. Natural IgM in immune equilibrium and harnessing their therapeutic potential. **J. Immunol.**, v. 188, n.3, p. 939-945, 2012.

KEYT, B. A.; BALIGA, R.; SINCLAIR, A. M.; CARROLL, S.; F. PETERSON, M. S. Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies. **Antibodies (Basel)**, v. 9, n. 4, p. 53. Dec. 2020. doi:10.3390/antib9040053.

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

MASOODI, K. Z.; LONE, S. M.; RASOOL, R. S. Ion-exchange chromatography. **Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology**, chapter 27, p. 151–154, 2021. doi:10.1016/b978-0-12-824449-4.00027-x

MIELKA, S. I.; GOZZE, I. Anticomplementary activity of human immunoglobulin G. I. Mechanism of the artifactual increase in anticomplementary activity of IgG during the assay. **Vox Sanguinis**, v. 29, p. 101-123, 1975.

MORAIS, V.; BERASAIN, P.; MASSALDI, H. Immunoglobulin Purification by Caprylic Acid. **Protein Downstream Processing**, v. 1129, p. 137–143, 2014. doi:10.1007/978-1-62703-977-2\_13

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga et al.; **Artmed**, 6. ed. 1250p., 2014.

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** v. 2, p. 3-11, 2005.

Ó'FÁGÁIN, C.; CUMMINS, P. M.; O'CONNOR B.F. Gel-Filtration Chromatography. **Methods Mol Biol**, v. 1485, p. 15-25. 2017. doi:10.1007/978-1-4939-6412-3\_2

OFOSSU, F. A.; FREEDMAN, J.; SEMPLE, J. W. Plasma-derived biological medicines used to promote Haemostasis. **Thromb. Haemost.**, v. 99, p. 851-862, 2008. doi:10.1160/TH07-10-0592.

PATTISON, J. R.; MACE, J. E. Elution patterns of rubella IgM, IgA, and IgG antibodies from a dextran and an agarose gel. **J. clin. Path.**, v. 28, p. 670-673, 1975. doi:10.1136/jcp.28.8.670.

- PEROSA, F.; CARBONE, R.; FERRONE, S.; DAMMACCO, F. Purification of human immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and ammonium sulphate. **J. Immunol. Methods**, v. 128, p. 9-16, 1990. doi:10.1016/0022-1759(90)90458-8.
- PESSOA JR., A; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biológicos. Rio de Janeiro: **Manole**, 2005. 720p.
- PORATH, J.; CARLSSON, J.; OLSSON, I.; BELFRAGE, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, v. 258, n. 5536, p. 598–599, 1975. doi:10.1038/258598a0
- PRAPULLA, S. G.; KARANTH, N. G. FERMENTATION (INDUSTRIAL) | Recovery of Metabolites. **Encyclopedia of Food Microbiology**, p. 822–833, 2014, doi:10.1016/b978-0-12-384730-0.00109-9
- RADOSEVISH, M.; BURNOUF, T. Intravenous immunoglobulin G: trends in production methods, quality control and quality assurance. **Vox Sang.**, v. 98, n. 1, p. 12-28, 2010.
- SCHALLER, J.; GERBER, S.; KÄMPFER, U.; LEJON, S.; TRACHSEL, C. Human blood plasma proteins: structure and function. **John Wiley & Sons**, p. 196, 2008. Homoken, NJ: Wiley, pp. 5–16.
- SCHROEDER H. W. Jr; CAVACINI, L. Structure of immunoglobulins. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 125, p. 41-52, 2010.
- SILVA, P. H. S. **A importância da garantia da qualidade e das boas práticas de fabricação na provisão do plasma como insumo para à indústria: uma contribuição no âmbito da política de sangue e hemoderivados.** 2010. 67p. Monografia de conclusão (Curso de especialização em vigilância sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Diretoria regional de Brasília, Brasília.
- SULKOWSKI, E. Purification of proteins by IMAC. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 1–7. Jan. 1985. doi:10.1016/0167-7799(85)90068-x
- TANAKA, K.; SAWATANI, E.; SHIGUEOKA, E. M.; CAMPOS, T. C. X. B.; NAKAO, H. C.; DIAS, G. A.; FUJITA, R. K.; ARASHIRO, F. A chromatographic method for the production of a human immunoglobulin G solution for intravenous use. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 11, p. 1375–1381, Nov. 1998. doi:10.1590/s0100-879x1998001100002
- 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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 1, p. 27–30, Jan. 2000. doi:10.1590/s0100-879x2000000100004
- VANÇAN, S.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. IMAC of human IgG: studies with IDA-immobilized copper, nickel, zinc, and cobalt ions and different buffer systems.

**Process Biochemistry**, v. 37, n. 6, p. 573–579. 2002. doi:10.1016/s0032-9592(01)00242-4

WHO. World Health Organization: **Global blood safety and availability**. Facts and figures from the 2007 Blood Safety Survey. 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs279/en/print.html>> Acesso em 11/2021.

WHO. World Health Organization. **Blood safety and availability**. Junho 2020. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/blood-safety-and-availability>>. Acesso em 11/2021.

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.