

**Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan**  
**Programa de Pós-graduação *Lato Sensu em Biotecnologia para Saúde-***  
***Vacinas e Biofármacos***

**Vitoria Correia Damasceno de Rezende**

**Purificação de IgM a partir de plasma humano empregando**  
**cromatografias de troca catiônica**

**São Paulo**  
**2024**

**Vitoria Correia Damasceno de Rezende**

**Purificação de IgM a partir de plasma humano empregando cromatografias de troca catiônica**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologias para a Saúde -Vacinas e Biofarmacos do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para Saúde- Vacinas e Biofarmacos.

Orientador (a): Elizabeth Cheng

**São Paulo**

**2024**

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

Rezende, Vitoria Correia Damasceno de  
Purificação de IgM a partir de plasma humano empregando cromatografias de troca catiônica / Vitoria Correia Damasceno de Rezende ; orientador(a) Elisabeth Cheng - São Paulo, 2024.  
64 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - .  
Versão corrigida final

1. Cromatografia líquida 2. Purificação de IgM. 3. Troca Catiônica. I. Cheng, Elisabeth. II. Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - . IV. Título.

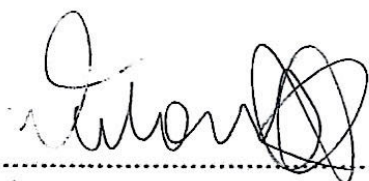
## AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Vitoria Correia Damasceno de Rezende, aluna do Curso de Especialização em Biotecnologias para a Saúde- Vacinas e Biofármacos, 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:

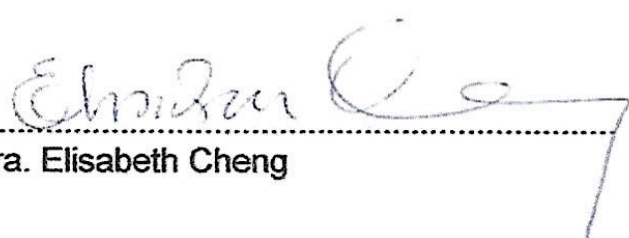
São Paulo, 08 de fevereiro de 2024



.....  
aluno(a)

De acordo:.....

Orientador(a): Dra. Elisabeth Cheng



## AGRADECIMENTOS

Ao **Instituto Butantan**, possibilitar o desenvolvimento deste trabalho, e ainda por abrirem suas portas e mostrarem para tantos alunos a ciência na visão de um centro de referência mundial. Um prazer enorme passar 1 ano nesse local que tanto ensina e que faz a ciência evoluir cada dia mais. Á todas as pessoas do **Laboratório de Desenvolvimento de Processos** por serem tão acolhedores, e estarem sempre dispostos a ajudar no que for preciso, e por tornarem os dias mais leves e divertidos.

Á **Secretária de Saúde do Estado de São Paulo**, pelo apoio financeiro dado durante todo o período da especialização.

Á minha orientadora, **Dra. Elisabeth Cheng**, a quem devo todo meu conhecimento adquirido nesses 12 meses de especialização, por toda dedicação mesmo em momentos difíceis, por toda confiança e por estar sempre disposta a me auxiliar no que for preciso.

Á **Priscila** por tanto me auxiliar nos projetos e por dividir todo seu conhecimento, tendo paciência e empatia em todos os momentos.

Ás minhas colegas de turma **Victoria e Gabriela**, por serem tão companheiras nesses 12 meses juntas, tornando os dias mais leves e divertidos. Obrigada por estarem juntas comigo em todos os momentos e por compartilharem o bom da vida.

Aos meus **familiares e amigos** por sempre acreditarem em mim e estarem comigo.

Ao meu namorado, **Pedro**, por me apoiar nos momentos bons e ruins, e por todo incentivo, me lembrando sempre do meu potencial.

Aos meus pais, **Pedro e Maria**, por tornarem tudo o que conquistei possível. Por acreditarem em mim e no meu potencial desde o início da minha trajetória da graduação a especialização. Obrigada por todo amor e confiança, amo vocês.

## RESUMO

REZENDE, Vitoria Correia Damasceno. **Purificação de IgM a partir de plasma humano empregando cromatografias de troca catiônica.** 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para Saúde- Vacinas e Biofarmacos) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

O plasma humano está repleto de proteínas terapêuticas que podem ser utilizadas no tratamento de várias doenças, entre essas proteínas estão as imunoglobulinas. O IgG é atualmente o hemoderivado mais importante porque é responsável por cerca de 30% do mercado, que era estimado em 20 bilhões de dólares em 2016 e continua a crescer. IgM tem múltiplas funções, como controle de infecções, produção de células dendríticas e controle da homeostase dos tecidual. Por conta de sua estrutura pentamérica, o IgM também pode-se ligar a antígenos com maior avidéz do que outras imunoglobulinas. Entretanto não existem concentrados de IgM disponíveis comercialmente. Neste trabalho estudamos a purificação de IgM derivada de plasma usando técnicas de cromatografia líquida e resinas que podem ser facilmente escalonadas. Na primeira etapa foi feita a purificação de plasma em uma coluna de gel-filtração Sepharose 4FF. A fração enriquecida de IgM F2 foi então usada como amostra de entrada para as purificações em resina de troca catiônica. Primeiramente foram feitos experimentos em Hi-Trap SP FF com a amostra sem diluir, diluída cinco e dez vezes. Em seguida escalonamos a purificação empregando uma coluna SP Sepharose FF de 23mL usando como amostra de entrada F2 diluída 10 vezes. Verificamos que o volume ideal de amostra aplicada era de 100mL que corresponde a 63mg de proteína de amostra. Verificamos que em pH 6,0 36% de IgM não é adsorvido na coluna e 50% é adsorvido. Em pH 5,0 IgM foi recuperado somente na fração de Eluição, porém a recuperação foi muito baixa (38%). O último passo foi realizar uma purificação em pH 5,0 usando gradiente de NaCl para eluição das proteínas adsorvidas. Devido a baixa concentração de proteínas nas frações recolhidas foi possível apenas observar por imunoturbidimetria que 37,3% de IgM elui no gradiente NaCl 300mM ao NaCl 500mM. Nessa fração os géis de poliacrilamida mostram que IgG e Albumina estão presentes. Os resultados obtidos são preliminares e ainda não permitem comparar a purificação em resina de troca catiônica com resina de troca aniônica.

**Palavras-chave:** Cromatografia líquida. Purificação de IgM. Troca Catiônica.

## ABSTRACT

REZENDE, Vitoria Correia Damasceno. Purification of IgM from human plasma using cation exchange chromatography. 2023. Monograph (Specialist in Biotechnology for Health - Vaccines and Biopharmaceuticals) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Human plasma is full of therapeutic proteins that can be used to treat several diseases, among these proteins are immunoglobulins. IgG is currently the most important blood product because it accounts for around 30% of the market, which was estimated at 20 billion dollars in 2016 and continues to grow. IgM has multiple functions, such as controlling infections, producing dendritic cells and controlling tissue homeostasis. Because of its pentameric structure, IgM can also bind to antigens with greater avidity than other immunoglobulins. However, there are no commercially available IgM concentrates. In this work we studied the purification of plasma-derived IgM using liquid chromatography techniques and resins that can be easily scaled up. In the first step, plasma was purified on a Sepharose 4FF gel-filtration column. The enriched IgM fraction called F2 was then used as sample for cation exchange resin purifications. Experiments were initially carried out on Hi-Trap SP FF with the undiluted F2, five times diluted F2 and ten times diluted F2. Then we scaled up the purification using a 23mL SP Sepharose FF column using F2 diluted 10 times as loading sample. Our results indicate that the best of sample volume was 100mL, which corresponds to 63mg of protein. At pH 6.0 36% of IgM was not adsorbed on the column and 50% was adsorbed. At pH 5.0 IgM was recovered only in the Elution fraction, but the recovery was very poor (38%). Finally we carry out a purification at pH 5.0 using NaCl gradient to elute the adsorbed proteins. Due to the low concentration of proteins in the collected fractions, it was only possible to observe by immunoturbidimetry that 37.3% of IgM eluted in the 300mM NaCl to 500mM NaCl gradient. In this fraction, polyacrylamide gels show that IgG and albumin were present. The results obtained were preliminary and did not yet allow comparison of purification using cation exchange resin with anion exchange resins.

**Keywords:** Liquid chromatography. IgM purification. Cation Exchange.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Principais hemoderivados obtidos através do fracionamento do plasma. 15	15
<b>Figura 2</b> -Taxa de doação de sangue por 1000 habitantes por região no Brasil em 2018 .....	16
<b>Figura 3</b> - Comparação entre estruturas das imunoglobulinas G e M. a) estrutura monomérica imunoglobulina G. b) estrutura pentamérica imunoglobulina M. ....	18
<b>Figura 4</b> - Descrições encontradas em literaturas abordando a Purificação de IgM..	20
<b>Figura 5</b> - Funcionamento de uma cromatografia por exclusão de tamanho.....	22
<b>Figura 6</b> - Demonstração do funcionamento de uma cromatografia de troca iônica..	23
<b>Figura 7</b> : Esquemática das purificações realizadas no trabalho .....	26
<b>Figura 8</b> - Coluna Hi-Trap SP FF conectada a seringa.....	28
<b>Figura 9</b> - Resina SP Sepharose FF em XK26 utilizada nas cromatografias realizadas neste trabalho.....	29
<b>Figura 10</b> : Curva de acetona 1% usada para determinação da eficiência do empacotamento.....	30
<b>Figura 11</b> - Esquema das purificações realizadas neste trabalho. ....	36
<b>Figura 12</b> - Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações das purificações de plasma em Sepharose 4FF. ....	37
<b>Figura 13</b> - Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações das purificações em Hi-Trap SP F.....	40
<b>Figura 14</b> - Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações da purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF com 714mL de entrada.....	43
<b>Figura 15</b> - Cromatograma purificação de F2 diluído SP Sepharose FF, pH 5,0.....	44
<b>Figura 16</b> - Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações da purificação de F2 diluída 10x em SP Sepharose FF com 300mL de entrada, pH 5,0 .....	46
<b>Figura 17</b> - Cromatograma da purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF com pH 6,0 e 100 mL de amostra de entrada.....	47
<b>Figura 18</b> - Cromatograma da purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF com pH 5,0 e 100 mL de amostra de entrada: .....	48
<b>Figura 19</b> - Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações das purificações em SP Sepharose FF com 100mL de entrada em pH 5,0 e 6,0. ....	53



<b>Figura 20</b> - Cromatograma de purificação SP Sepharose FF com gradiente de NaCl pH 5,0.....	54
<b>Figura 21</b> - Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações da purificação em SP Sepharose FF com gradiente de NaCl.....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Necessidades de hemoderivados para o ano de 2014 e necessidades projetadas a outros anos.....	17
<b>Tabela 2-</b> Características das imunoglobulinas .....	18
<b>Tabela 3-</b> Frações coletadas na purificação e seus respectivos volumes .....	27
<b>Tabela 4-</b> Amostras e volume obtidos na purificação SP Sepharose FF em XK26 ..	31
<b>Tabela 5-</b> etapas da purificação em SP Sepharose FF com gradiente de NaCl: A= tampão de equilíbrio; B= tampão de eluição .....	32
<b>Tabela 6-</b> Tubos recolhidos no gradiente de NaCl na etapa de eluição.....	32
<b>Tabela 7-</b> Quantidade de reagente e amostra aplicados para cada imunoglobulina	33
<b>Tabela 8-</b> Diluições utilizadas para o preparo da curva de calibração do teste de Bradford.....	34
<b>Tabela 9-</b> Reagentes utilizados no preparo do gel de poliacrilamida 10% com 1mm de espessura:.....	35
<b>Tabela 10-</b> Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação de F2 sem diluição em Hi-Trap SP FF, segundo o método de Bradford .....	38
<b>Tabela 11-</b> Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação de F2 5 vezes diluída em Hi-Trap SP FF, segundo o método de Bradford .....	38
<b>Tabela 12-</b> Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação de F2 10 vezes diluída em Hi-Trap SP FF, segundo o método de Bradford .....	39
<b>Tabela 13-</b> Determinação da concentração de proteína nas frações da purificação empregando F2 diluído 10 vezes em SP Sepharose FF.....	41
<b>Tabela 14-</b> Dosagem de IgM na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF .....	41
<b>Tabela 15-</b> Dosagem de IgG na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF .....	42
<b>Tabela 16-</b> Dosagem de IgA na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF .....	42
<b>Tabela 17-</b> Determinação da concentração de proteína nas frações da purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, pH 5,0.....	44
<b>Tabela 18-</b> Dosagem de IgM na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, pH 5,0.....	45

<b>Tabela 19-</b> Dosagem de IgG na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, pH 5,0.....	45
<b>Tabela 20-</b> Dosagem de IgA na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, pH 5,0.....	46
<b>Tabela 21-</b> Determinação da concentração de proteína nas frações da purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, com 100mL de amostra de entrada e pH 6,0.	48
<b>Tabela 22-</b> Determinação da concentração de proteína nas frações da purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, com 100mL de amostra de entrada e pH 5,0.	49
<b>Tabela 23-</b> Dosagem de IgM na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, pH 6,0.....	50
<b>Tabela 24-</b> Dosagem de IgG na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, pH 6,0.....	50
<b>Tabela 25-</b> Dosagem de IgM na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, pH 5,0.....	51
<b>Tabela 26-</b> Dosagem de IgG na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, pH 5,0.....	51
<b>Tabela 27-</b> Dosagem de IgA na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, pH 5,0.....	52
<b>Tabela 28-</b> Determinação da concentração de proteína nas frações da purificação de F2 10x diluído em SP Sepharose FF com gradiente de NaCl, com 100mL de amostra de entrada e pH 5,0.....	55
<b>Tabela 29-</b> Recuperação de IgM na purificação SP Sepharose FF com gradiente de NaCl .....	56
<b>Tabela 30-</b> Dosagem de IgG na purificação SP Sepharose FF com gradiente de NaCl .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**Pool:** Junção de uma ou mais partes de plasma ou frações provenientes de uma purificação.

**F2:** Fração proveniente da purificação em 4FF Sepharose

**Ig:** Imunoglobulina

**FF:** Flow Through- fração coletada durante a purificação que corresponde a parte onde as proteínas não foram adsorvidas.

**VC:** Volume (s) de coluna

**BSA:** Albumina de Soro Bovina

**PFC:** Plasma Fresco Congelado

**PS:** Plasma Simples

**mAb:** Anticorpo Monoclonal

**UI:** Unidade Internacional

**Kg:** quilograma

**L:** litros

**Hab:** Habitantes

**µg:** micrograma

**µl:** microlitro

**4FF:** Sepharose 4 Fast Flow

**SDS:** dodecil sulfato de sódio

**psi:** unidade de pressão

**pI:** ponto isoelétrico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
	1.1 Hemoderivados .....	15
	1.2 Hemoderivados no Brasil.....	16
	1.3 Imunoglobulinas .....	17
	1.4 Purificação de Imunoglobulina M.....	19
	1.5 Purificação de proteínas utilizando Cromatografia de Troca Iônica ....	21
	1.6 Cromatografia de Gel Filtração.....	21
	1.7 Cromatografia de Troca Iônica.....	22
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
	2.1 Geral	24
	2.2 Específicos .....	24
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>25</b>
	3.1 Preparo do Plasma.....	25
	3.2 Cromatografias .....	25
	3.2.1 Purificações de plasma em 4FF Sepharose .....	26
	3.2.2 Purificação em Hi-Trap SP FF .....	27
	3.2.3 Empacotamento da resina SP Sepharose FF em coluna XK26 .....	28
	3.2.4 Purificação de F2 em coluna SP Sepharose FF pH 6,0 .....	30
	3.2.5 Purificação de F2 em SP Sepharose FF em XK26 pH 5,0 .....	31
	3.2.6 Purificação de 100 mL de F2 em SP Sepharose FF pH 5,0 e 6,0. ...	31
	3.2.7 Purificação de F2 em SP Sepharose FF com gradiente de NaCl....	32
	3.3 Métodos Analíticos .....	33
	3.3.1 Imunoturbidimetria .....	33
	3.3.2 Teste de Bradford .....	33

3.3.3	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	34
4.	RESULTADOS.....	36
4.1	Purificação em Sepharose 4FF .....	36
4.2	Purificação em Hi-Trap SP FF .....	37
4.3	Purificação de F2 em SP Sepharose FF pH 6,0- 714mL.....	40
4.4	Purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF pH 5,0- 300mL.....	43
4.5	Purificações de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF pH 5,0 e 6,0- 100mL de amostra.....	47
4.6	Purificação de F2 em SP Sepharose FF com gradiente de NaCl .....	53
5	DISCUSSÃO .....	58
6	CONCLUSÕES .....	60
7	PERSPECTIVAS.....	61
	REFERÊNCIAS.....	61

# 1 INTRODUÇÃO

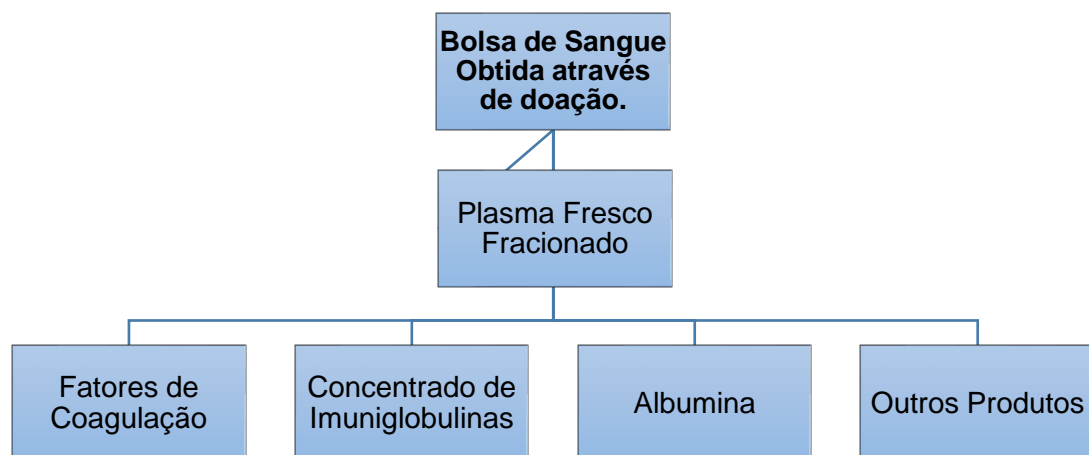
## 1.1 Hemoderivados

Os hemoderivados são caracterizados como medicamentos provenientes do fracionamento industrial do plasma humano (FELIZ, 2021). O sangue obtido através de doações após a coleta é processado e fracionado, sendo plasma um dos hemocomponentes obtidos. (REDETEC,2006).

O plasma pode ser dividido em dois tipos, o Plasma Fresco Congelado (PFC), ou o Plasma Simples (PS). O plasma após sua obtenção quando congelado em até 8 horas em até  $-30^{\circ}\text{C}$  é chamado PFC e possui uma validade de até 12 meses. Cada bolsa de PFC possui cerca de 70% da atividade original dos fatores VIII (FVIII) e V de coagulação. O PFC é utilizado para separar o crioprecipitado, que é utilizado para produzir o FVIII. Em contrapartida o plasma quando congelado de 8 a 24 horas após sua obtenção, é denominado PS, e também é utilizado para produção industrial de hemoderivados (FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE,2018).

Os produtos provenientes de hemoderivados são considerados biofármacos essenciais no tratamento de diversas doenças caracterizadas pela falta de proteínas provenientes do plasma humano, sendo as principais as imunodeficiências primárias ou secundárias, hemofilias A e B (COVAS, 2014). Na figura 1, é possível observar os principais hemoderivados obtidos a partir da doação:

**Figura 1** - principais hemoderivados obtidos através do fracionamento do plasma.



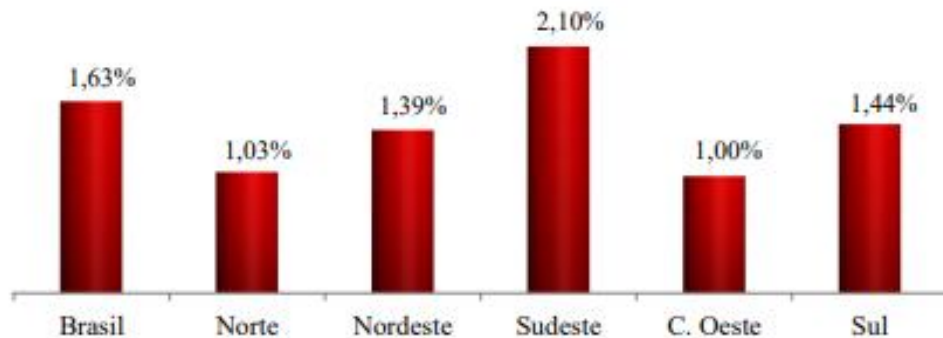
Fonte: (Adaptado de COVAS,2014)

A OMS considera que hemoderivados como a albumina, FVIII e FIX de coagulação e as imunoglobulinas, são medicamentos essenciais para os sistemas de saúde, a nível mundial (COVAS, 2014).

### 1.2 Hemoderivados no Brasil

Os serviços para obtenção de hemoderivados no Brasil, em sua maioria são regidos pela Lei do Sangue (Lei nº 10.205/2001), e pela Anvisa. A Lei do Sangue rege todas as atividades que envolvam a coleta, processamento, estocagem, distribuição e transfusão de sangue. A Lei nº 9.782/1999 determina que a ANVISA, normatize, controle e fiscalize produtos e serviços de interesse para a saúde. Na figura 2 é possível observar a taxa de doação por região no Brasil.

**Figura 2** -Taxa de doação de sangue por 1000 habitantes por região no Brasil em 2018



Fonte: ANVISA, 2018

A produção de hemoderivados é cada vez mais necessária, dada a sua importância no tratamento de diversas doenças, porém no Brasil essa produção ainda não é suficiente (COVAS,2014). Na tabela 1 é possível observar a necessidade de hemoderivados necessárias para o ano de 2014 e necessidade projetadas para outros anos.



**Tabela 1-** Necessidades de hemoderivados para o ano de 2014 e necessidades projetadas a outros anos

<b>Produto</b>	<b>Nível de Necessidade</b>	<b>Quantidade de Produto</b>	<b>Litros de Plasma necessários</b>
<b>Imunoglobulinas</b>	2014-10g/1000hab	2T	400.000
	36g/1000hab	7,2T	1.440.000
	64 g/1000hab	12,8T	2.560.000
<b>Albumina</b>	2014- 1g-1000hab	200Kg	8.000
	150g/ 1000hab	30T	1.200.000
	300g/ 1000hab	60T	2.400.000
<b>Fator VIII</b>	3UI/ hab	600.000.000 UI	4.000.000
	5 UI/ hab	1.000.000.000 UI	6.700.000

Fonte: COVAS,2014.

### 1.3 Imunoglobulinas

As imunoglobulinas ou anticorpos são glicoproteínas, que em resposta a um agente imunogênico são produzidas pelos plasmócitos (MAYER; HOPKINS, [s.d.]).

Pode-se citar como função das imunoglobulinas a ligação a antígenos, levando a uma possível proteção do hospedeiro. Outra função são as funções efectoras, como a fixação ao complemento, gerando lise de células e liberação de moléculas biologicamente ativas, e a ligação a diversos tipos de células, como células fagocitárias, linfócitos (MAYER; HOPKINS, [s.d.]).

Existem cinco classes de imunoglobulinas: IgA, IgG, IgM, IgD e IgE (MINISTÉRIO DA SAÚDE,2023). Na tabela 2 é possível observar as principais características entre as cinco imunoglobulinas:

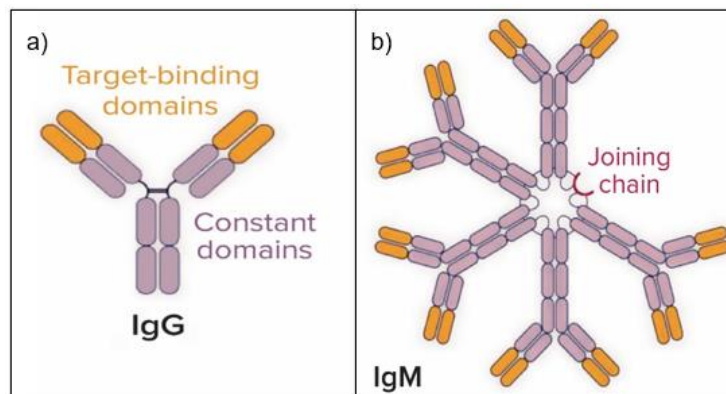
**Tabela 2-** Características das imunoglobulinas

Classe de imunoglobulina	Estrutura da Subunidade	Massa Molecular (kDa)	Faixa de Concentração (g/L)
<b>IgA</b>	$\alpha_2\kappa/\lambda_2$	150	0,5-3,5
	$(\alpha_2\kappa/\lambda_2)_n J$ ( $n=2-4$ )	390-690	
<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>	$\gamma_2\kappa_2/\lambda_2$	150	
<b>IgG1 (60%)</b>		150	4,2-13,0
<b>IgG2 (30%)</b>		150	1,2-7,5
<b>IgG3 (4%)</b>		170	0,4-7,5
<b>IgG4 (6%)</b>		150	0,01-29
<b>IgM</b>	$(\mu_2\kappa_2/\lambda_2)_5 J$	960	0,5-2,0

Fonte: (Adaptado de Schaller,2008)

A IgM possui cadeia leve de 25 kDa e cadeia pesada de 75 kDa (KRIDIN K, AHMED AR, 2020). É uma glicoproteína plasmática pentamérica, de tamanho grande, possui cerca de 970 kDa, e a mesma representa de 7-10% das imunoglobulinas presentes no plasma. Também existe a IgM em formato de hexâmetro. Na figura 3 pode-se observar a estrutura das imunoglobulinas M e G.

**Figura 3-** Comparação entre estruturas das imunoglobulinas G e M. a) estrutura monomérica imunoglobulina G. b) estrutura pentamérica imunoglobulina M.



Fonte: SCOTT; TSAI,2022

A cadeia pentamérica da IgM possui 10 sítios de ligação com os antígenos, o que gera uma valência maior do que a de outras imunoglobulinas, permitindo assim que a IgM se ligue a antígenos com uma maior avidéz (KRIDIN K, AHMED AR, 2020).

IgM possui algumas funções como:

- A regulação do desenvolvimento de células B;
- Depuração de células apoptóticas;
- Modulação de processos inflamatórios e autoimunes;
- Mediação da eliminação de células cancerígenas;
- Produção de células dendríticas;
- Prevenção de doenças infecciosas e autoimunes.

A concentração de IgM no sangue é de 0,2-1,4 g/L enquanto de IgG é de 6,4-14,3 g/L (PADILLA, 2021). IgG é a segunda maior proteína em concentração no sangue, ficando atrás apenas da albumina.

Existe um produto terapêutico comercializada pela empresa Biotest, chamado por Pentaglobin. É um preparado de imunoglobulinas intravenosa enriquecida com IgM (GAUTAM; LOH, 2011). Em casos de sepse severa, esse produto foi mais eficiente do que preparações comerciais de IgG (GAUTAM; LOH, 2011). Esse efeito foi atribuído a presença de IgM.

#### **1.4 Purificação de Imunoglobulina M**

A cada dia mais é necessário encontrar estratégias de purificação de imunoglobulina M, visto que não há muitos trabalhos que descrevem a purificação de IgM. A purificação de IgM já foi feita empregando diversas técnicas cromatográficas ou uma combinação de precipitação com técnicas cromatográficas (Figura 4).

**Figura 4-** Descrições encontradas em literaturas abordando a Purificação de IgM

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

Fonte: IWASHITA, 2016

A purificação por precipitação utilizando sulfato de amônio, polietilenoglicol e ácido caprílico são algumas formas de purificação já descritas na literatura, um ponto positivo deste tipo de purificação é que pelas proteínas possuem diferentes coeficientes de sedimentação, elas podem ser separadas utilizando diferentes concentrações de sulfato de amônio, polietilenoglicol e ácido caprílico. Porém um ponto negativo é o fato de ser um método drástico que pode levar a desnaturação das proteínas (IWASHITA, 2016).

Uma outra forma de purificação de IgM muito eficiente é a utilização de cromatografia por troca iônica, mais especificamente troca aniônica, sendo um método eficiente e de baixo custo. A gel-filtração também é muito utilizada, e seria a melhor técnica para separar IgM e IgG, porém no plasma estão presentes outras proteínas contaminantes, o que dificulta a purificação sendo necessário outros métodos adjacentes, por isso geralmente a gel-filtração é utilizada apenas como polimento (IWASHITA,2016).

Cada método possui seus pontos positivos e negativos, e por isso são necessários diversos estudos para identificar um método que seja eficiente e de baixo custo, obtendo um bom custo-benefício.

Neste trabalho desenvolvemos uma estratégia experimental utilizando resina de troca catiônica e variação de pH para purificação de IgM.

### **1.5 Purificação de proteínas utilizando Cromatografia de Troca Iônica**

O processo de purificação de proteínas através de cromatografia líquida é muito usado atualmente porque é possível obter proteínas com alta pureza e com baixos custos.

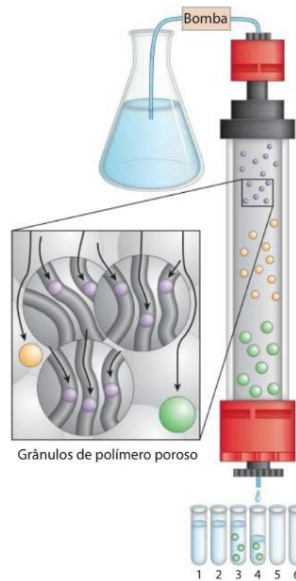
Uma coluna cromatográfica padrão inclui um material poroso (matriz) sólido que fica apoiado no interior de uma coluna, que pode ser de vidro ou plástico. Uma solução que é a fase móvel, flui pela matriz, que é a fase estacionária (LEHNINGER,2014).

Existem diversos tipos de cromatografia líquida, como a de troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de permeação em gel (gel-filtração), e de afinidade (COSKUN,2016). Neste trabalho utilizamos dois tipos de cromatografias a de gel-filtração, que foi a primeira etapa de purificação e em seguida avaliamos a utilização de uma troca catiônica.

### **1.6 Cromatografia de Gel Filtração**

Na cromatografia de gel filtração a separação das proteínas se baseia na diferença de tamanhos moleculares (COSKUN,2016), em que as proteínas maiores são eluídas mais cedo do que as proteínas menores (Figura 5), porque as proteínas maiores não conseguem adentrar nos poros, sendo eluídas mais rapidamente, enquanto as proteínas menores entram nas cavidades o que retarda sua eluição (LEHNINGER,2014).

**Figura 5-** Funcionamento de uma cromatografia por exclusão de tamanho



Fonte: LEHNINGER, 2014

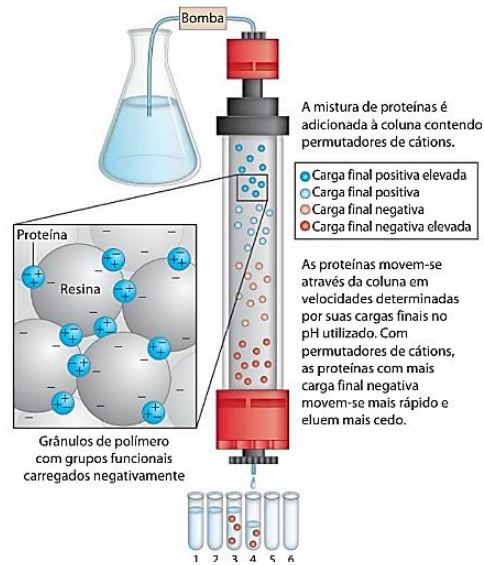
Neste trabalho utilizamos a resina Sepharose 4FF da Cytiva, ela é uma resina cromatográfica de exclusão por tamanho desenvolvida para processamento industrial em altas vazões e em pressões moderadas. Essa resina possui uma matriz reticulada de 4% de agarose, sua rigidez proporciona altas taxas de fluxo, que segundo o fabricante proporciona boa resolução em um tempo mínimo (CYTIVA,2023).

### 1.7 Cromatografia de Troca Iônica

Na cromatografia de troca iônica, se explora as diferenças no sinal e carga elétrica final das proteínas em um determinado pH. A resina contém grupos carregados ligados, que podem ser de dois tipos: os aniônicos e os catiônicos. A afinidade de cada proteína por cada grupo é determinada pelo pH e pela concentração de íons de sais livres, sendo assim é possível realizar a separação das proteínas por mudanças gradativas no pH e na concentração de sal, criando gradientes de pH ou de sal (LEHNINGER, 2014).

Na purificação utilizando troca catiônica a resina é carregada negativamente, fazendo com as proteínas que possuem carga positiva interajam com a coluna, enquanto as proteínas com carga negativa migram mais rápido por não possuírem essa interação (LEHNINGER,2014). Na troca aniônica ocorre exatamente o contrário, a resina possui cargas positivas atraindo proteínas carregadas negativamente. (LEHNINGER). Na figura 6 pode-se observar melhor como ocorre esse processo.

**Figura 6-** Demonstração do funcionamento de uma cromatografia de troca iônica



Fonte: LEHNINGER, 2014.

Neste trabalho foi utilizado a resina de troca catiônica SP Sepharose FF (CYTIVA,2023)., que é composta por esferas reticuladas de 6% de agarose com fortes grupos de troca catiônica sulfopropil (SP). Ela possui uma grande estabilidade química o que permite protocolos de limpeza no local e higienização, também é indicada para escalonamentos. Inicialmente utilizamos a Hi-Trap SP FF (CYTIVA, 2023), que é uma coluna pré empacotada de 1mL. E em seguida empacotamos e utilizamos uma coluna SP Sepharose FF de 23mL.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Purificar a Imunoglobulina M (IgM) a partir do plasma humano, utilizando cromatografia de troca iônica.

### **2.2 Específicos**

Avaliar a utilização de resina de troca catiônica na purificação de IgM



### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Preparo do Plasma

O plasma simples utilizado nas purificações foi cedido gentilmente pela Fundação Pró Sangue- Hemocentro de São Paulo, e foram armazenadas em freezer -80°C até sua utilização.

Um dia antes do uso, 4 bolsas foram retiradas do freezer -80°C e deixadas *overnight* no freezer -20°C. No dia seguinte as bolsas foram retiradas do freezer e descongeladas em banho maria á 37°C. Foi preparado um *pool* a partir destas 4 bolsas, resultando num volume total de 57 mL. Em seguida foi adicionado 0,115mL de heparina (1000 UI/L de plasma). Foram feitas dez alíquotas de 1mL cada para realização dos testes.

O *pool* das bolsas de plasma foi dividido em duas metades iguais com volumes de 284,5mL cada para as duas purificações.

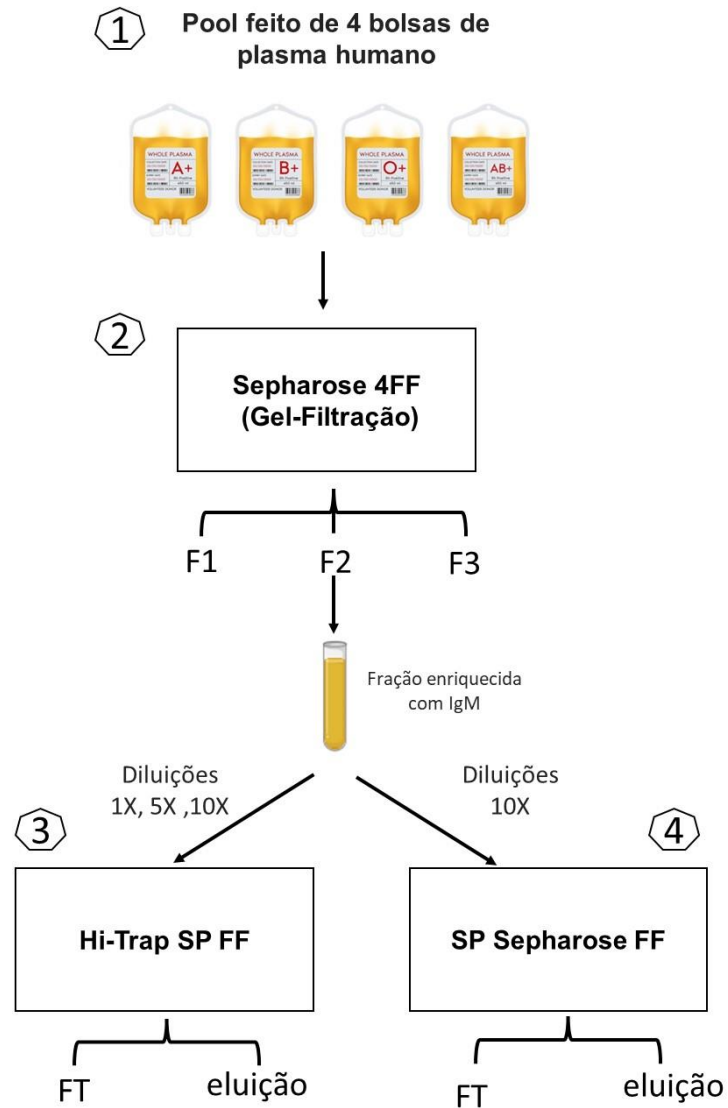
Tanto o *pool* como as frações alíquotas foram guardadas no freezer -80°C até sua utilização.

#### 3.2 Cromatografias

As purificações desse trabalho foram realizadas em dois cromatógrafos, no *NGC Chromatography Systems da BioRad*, controlado por *ChromeLab Software* e no *AKTA Explorer da Cytiva* controlado por *UNICORN software*.

A figura 7 mostra o esquema das cromatografias realizadas neste trabalho.

**Figura 7:** Esquematização das purificações realizadas no trabalho



Fonte: Própria autora

### 3.2.1 Purificações de plasma em 4FF Sepharose

As duas purificações foram feitas em coluna XK50 com resina 4FF Sepharose de 1.178mL. As duas purificações foram realizadas com o objetivo de obter a amostra de entrada para as purificações em coluna de troca catiônica.

O tampão utilizado neste experimento foi o tampão citrato 20mM, NaCl 150mM, CaCl<sub>2</sub> 2,6mM pH 7,0.

O equilíbrio da coluna foi feito com 1,5VC do tampão e em seguida aplicou-se 0,2VC de plasma. As amostras coletadas foram denominadas F1, F2 e F3. O fluxo utilizado foi de 6,5mL/min. O volume coletado em cada fração está mostrado na Tabela 3.

**Tabela 3-** Frações coletadas na purificação e seus respectivos volumes

<i>Amostra</i>	<i>Volume (mL)</i>
<i>F1</i>	300
<i>F2</i>	400
<i>F3</i>	600

Fonte: Própria autora

Ao final da purificação, foi feita a limpeza da coluna e dos tubos com NaOH 0,5M e H<sub>2</sub>O purificada.

Foram feitas 10 alíquotas de 1mL de cada fração coletada para testes e as mesmas foram armazenadas em freezer -80°.

Ao final da segunda purificação em 4FF Sepharose, foi feito um pool com o F2 de cada uma das purificações, este foi medido em proveta totalizando 800mL de F2, que foram aliqotados em 17 tubos de centrífuga do tipo Falcon contendo 45mL cada, estes foram congelados em freezer -20°C até o seu uso.

### **3.2.2 Purificação em Hi-Trap SP FF**

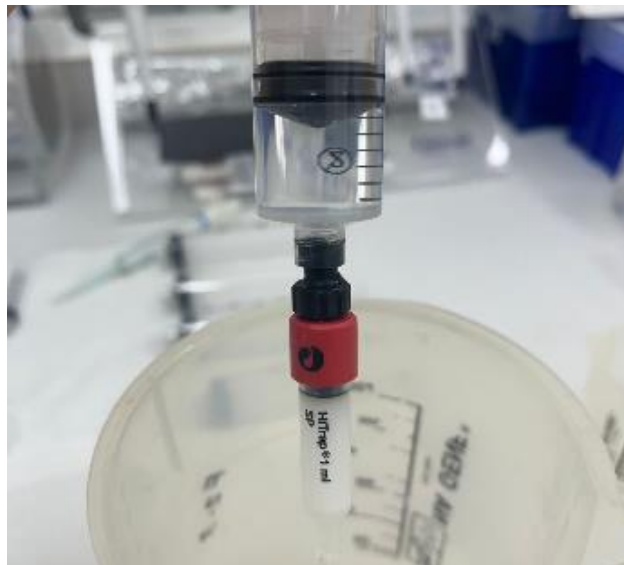
A Hi-Trap SP FF utilizada foi a de 1 mL, e as três purificações foram realizadas manualmente com o auxílio de uma seringa (Figura 8). Foram realizadas três purificações empregando 3 diluições diferentes, sendo a primeira com o F2 sem diluição, a segunda com ele diluído 5 vezes e a terceira com ele diluído 10 vezes.

Para iniciar a purificação a coluna foi equilibrada com 10VC do tampão fosfato 20mM, NaCl 150mM, pH 6,0, em seguida aplicamos 3mL de F2, seguido de uma lavagem com mais 10VC do tampão de equilíbrio. As proteínas foram eluidas com

10VC do tampão de eluição fosfato 20mM, NaCl 500mM pH 6,0. As amostras coletadas foram denominadas *Flow Through* (FT), Reequilíbrio (Reeq) e Eluição 1 e Eluição 2.

Após a purificação a coluna foi lavada com 10VC de NaCl 2M, 10VC de NaOH 1M e 10VC de H<sub>2</sub>O purificada. A coluna foi deixada em água após a primeira e a segunda purificação e em Etanol 20% após a terceira.

**Figura 8-** Coluna Hi-Trap SP FF conectada a seringa.



Fonte: Própria autora

### 3.2.3 Empacotamento da resina SP Sepharose FF em coluna XK26

A coluna foi empacotada de acordo com o procedimento recomendado pelo fabricante da resina.

Inicialmente foi feito o preparo da resina SP Sepharose FF de troca catiônica. Por estar decantada em um galão de 5 litros, foi necessário homogeneizar delicadamente a resina. Transferimos cerca de 200mL para um béquer, dos quais retiramos 50mL. Em um tubo de centrifuga do tipo Falcon, foi feita a lavagem da resina com água purificada 3 vezes para retirar a solução de estocagem.

A altura da coluna após o empacotamento foi 4,5 cm e o volume de coluna calculado foi 23,88 ml. O cálculo feito para determinar o volume da coluna foi:

$$Vol = \text{área da base} \times h \text{ (altura)} \quad \text{Equação 1}$$

$$Vol = 5,307 \times 4,5 = 23,88\text{mL}$$

$$\begin{aligned} \text{área da base} &= \pi r^2 \\ \text{área da base} &= 3,14 \times (1,3)^2 \\ \text{área da base} &= 5,307 \text{ cm}^2 \end{aligned} \quad \text{Equação 2}$$

O raio é a metade do diâmetro da coluna, como a XK26 possui 2,6 cm de diâmetro seu raio, portanto é 1,3cm. Na Figura 9 é possível observar a resina SP Sepharose FF empacotada em coluna XK26.

**Figura 9-** Resina SP Sepharose FF em XK26 utilizada nas cromatografias realizadas neste trabalho



Fonte: Própria autora

Após o empacotamento foi realizado o teste de eficiência da coluna (Figura 10). Para tanto foi usado 1% do volume de coluna de acetona 1%. O fluxo utilizado foi de 2,65mL/min e o comprimento de onda utilizado foi 280nm. Ao final realizamos os seguintes cálculos.

Primeiro calculamos a altura de um prato teórico (HEPT) usando a equação:

$$HEPT = \frac{L}{N}$$

Onde L é a altura da coluna e N é o número de pratos teóricos, calculado por:

$$N = 5,54 \times \left(\frac{V_r}{W_r}\right)^2$$

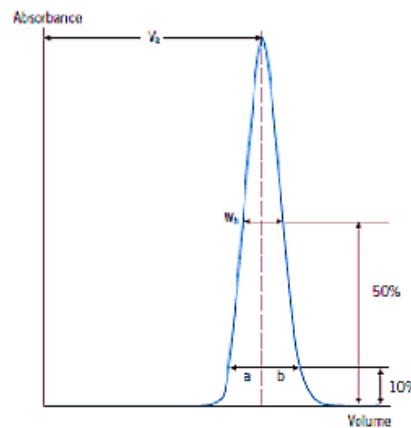
Onde  $V_r$  é o volume de eluição da amostra medido a partir da aplicação da amostra e  $W_r$  é a largura do pico na metade da coluna. E por fim é possível calcular o número de pratos teóricos por metro de resina ( $N/m$ ) com a equação:

$$\frac{N}{m} = \frac{N}{L}$$

Também é calculado o fator de assimetria da coluna ( $A_s$ ) dividindo a largura da segunda metade do pico ( $b$ ) pela largura da primeira metade do pico ( $a$ ), e ambos são medidos a 10% da altura do pico, usando a equação:

$$A_s = \frac{b}{a}$$

**Figura 10:** Curva de acetona 1% usada para determinação da eficiência do empacotamento



Fonte: Cytiva,2023

### 3.2.4 Purificação de F2 em coluna SP Sepharose FF pH 6,0

Oitenta mL de F2 foram diluídos e aplicados na coluna. O fluxo utilizado durante a purificação foi de 25 mL/min.

Iniciamos a purificação equilibrando a coluna com 5VC do tampão de equilíbrio fosfato 20mM, NaCl 15mM pH 6,0. Em seguida aplicamos à coluna 714 mL de F2 diluído. O reequilíbrio da coluna foi feito com 10VC do tampão de equilíbrio e por fim foi feita a eluição com 5VC do tampão de eluição fosfato 20mM, NaCl 500mM pH 6,0.

A lavagem da coluna foi feita com 5VC de NaCl 2M, 2VC de NaOH 1M e 10VC de H<sub>2</sub>O purificada, e ao final a coluna foi deixada em ETOH 20%.

As frações de amostras obtidas foram FT, Reeq, Eluição 1 e Eluição 2, na tabela 4 está descrito o volume de cada uma.

**Tabela 4-** Amostras e volume obtidos na purificação SP Sepharose FF em XK26

Amostra	Volume (mL)
FT	790
Reeq	168
Eluição 1	73
Eluição 2	36

Fonte: Própria autora

### 3.2.5 Purificação de F2 em SP Sepharose FF em XK26 pH 5,0

Primeiramente foi feito o equilíbrio da coluna com 5VC do tampão de equilíbrio acetato 20mM, NaCl 15mM pH 5,0. Em seguida foram aplicados 300mL de F2, o reequilíbrio da coluna foi feito com 10VC do tampão de equilíbrio e por fim foi feita a eluição com 5VC do tampão de eluição acetato 20mM, NaCl 500mM pH 5,0.

As amostras obtidas foram FT, Reeq e Eluição.

### 3.2.6 Purificação de 100 mL de F2 em SP Sepharose FF pH 5,0 e 6,0.

Foi descongelado em temperatura ambiente um tubo de centrifuga contendo 45 mL de F2. A amostra de entrada foi filtrada em *Glass Fibre Prefilters* da MERCK, os 45mL foram diluídos 10 vezes, totalizando 450 mL que foram divididos, usadas para as purificações em pH 5,0 e 6,0. Para a purificação em pH 5,0, a amostra de entrada F2 teve o pH ajustado com HCl.

Primeiramente foi feito o equilíbrio da coluna com 5VC do tampão de equilíbrio fosfato 20mM, NaCl 15mM, pH 6,0. Em seguida aplicamos 100 mL de F2. O reequilíbrio da coluna foi feito com 10VC do tampão de equilíbrio e por fim foi feita a eluição com 5VC do tampão de eluição fosfato 20mM, NaCl 500mM, pH 6,0.

Na purificação realizada em pH 5,0 foram empregadas as mesmas condições experimentais da purificação em pH 6,0, empregando tampões de acetato 20mM contendo NaCl 15mM e NaCl 500mM em pH 5,0.

A lavagem da coluna foi feita com 5VC de NaCl 2M, 2VC de NaOH 1M e 10VC de H<sub>2</sub>O purificada, e ao final a coluna foi deixada em ETOH 20%.

### 3.2.7 Purificação de F2 em SP Sepharose FF com gradiente de NaCl

Primeiramente foi descongelado em temperatura ambiente um tubo de 45mL de F2, que ao descongelar foi filtrado em *Glass Fibre Prefilters* da MERK, esses 45mL foram diluídos 10 vezes e tiveram seu pH ajustado para 5,0.

Os tampões usados para compor os gradientes foram: acetato 20mM, pH 5,0 e acetato 20mM, NaCl 500mM, pH 5,0.

A tabela 5 mostra as etapas de purificação e seus respectivos volumes.

**Tabela 5-** etapas da purificação em SP Sepharose FF com gradiente de NaCl: A= tampão de equilíbrio; B= tampão de eluição

<b>ETAPA</b>	<b>Volume (VC)</b>
Equilíbrio com Tampão acetato 20mM, pH 5,0 pH 5,0	5
Amostra (F2)	100mL
Reequilíbrio com acetato 20mM, pH 5,0 0	10
Gradiente NaCl 0mM – NaCl 300mM	10
Gradiente NaCl 300mM – NaCl 500mM	5
NaCl 500mM	3

Fonte: Própria autora

A lavagem da coluna foi feita com 5VC de NaCl 2M, 2VC de NaOH 1M e 10VC de H<sub>2</sub>O purificada, e ao final a coluna foi deixada em ETOH 20%.

Foram recolhidas as frações FT, Reeq. Nos gradientes foram recolhidas frações de 5mL em 5m, conforme a tabela 6.

**Tabela 6-** Tubos recolhidos no gradiente de NaCl na etapa de eluição

<b>ETAPA</b>	<b>TUBOS</b>
Eluição Gradiente 0mM – 300mM	1-41
Eluição Gradiente 300mM – 500mM	42-90
Eluição – 500mM	90-115

Fonte: Própria autora



### 3.3 Métodos Analíticos

#### 3.3.1 Imunoturbidimetria

Neste trabalho utilizamos o calibrador de proteína TOPKAL MULT TURBO, Kovalent e os reagentes IgG Mono, IgA Mono e IgM Mono, também da Kovalent. Os volumes usados foram ajustados para utilização em microplaca de 96 poços, mantendo as mesmas proporções descritas pelo fabricante.

Para a construção da curva de calibração foram feitas diluições de 1:10, 1:15, 1:20, 1:40 e 1:160 do calibrador usando solução salina 0,9%.

A quantidade de amostra e reagente aplicados na microplaca de 96 poços para quantificação das imunoglobulinas podem ser observados na tabela 7.

**Tabela 7-** Quantidade de reagente e amostra aplicados para cada imunoglobulina

<i>Dosagem</i>	<i>Amostra (<math>\mu\text{L}</math>)</i>	<i>Reagente (<math>\mu\text{L}</math>)</i>
<i>IgM</i>	12	200
<i>IgG</i>	2	250
<i>IgA</i>	3,2	200

Fonte: Própria autora

Após a aplicação das amostras e reagente na microplaca, a mesma é incubada de 10 a 15 minutos em temperatura ambiente e levado para leitura no comprimento de onda 340nm.

#### 3.3.2 Teste de Bradford

Este é um método de quantificação de proteínas totais que utiliza o corante “Coomassie brilliant Blue” G-250 (DIMAS, et all,1998). As proteínas são quantificadas devido a interação das cadeias laterais dos aminoácidos básicos e aromáticos com o corante (DIMAS, et all, 1998 apud COMPTON,1985). O reagente utilizado neste trabalho foi o Protein-Assay da BioRad.

Inicialmente é necessário diluir o reagente usando 1 parte de reagente + 4 partes de água purificada. É feita também uma curva de calibração utilizando BSA 0,5mg/mL como padrão. Os pontos da curva foram preparados conforme a tabela 8.

**Tabela 8-** Diluições utilizadas para o preparo da curva de calibração do teste de Bradford.

<i>Curva</i>	<i>BSA 0,5 mg/mL (<math>\mu</math>L)</i>	<i>NaCl 0,9% (<math>\mu</math>L)</i>
<i>P5</i>	10	-
<i>P4</i>	30	10
<i>P3</i>	10	10
<i>P2</i>	10	30
<i>P1</i>	10	90
<i>Branco</i>	-	20

Fonte: Própria autora

Após o preparo da curva de calibração, em uma microplaca de 96 poços, foram pipetados 10 $\mu$ l de amostra + 200  $\mu$ l de reagente. Se necessário as amostras foram concentradas ou diluídas. Por fim incubou-se a microplaca por 5 min em temperatura ambiente e a análise foi feita no leitor de microplacas LMR-96 da Locus em 595nm.

### 3.3.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Inicialmente foi feito o preparo das amostras. Se necessário, as amostras foram concentradas adicionando-se acetona gelada na proporção 1 parte de amostra para 4 partes de acetona. Em seguida as amostras são deixadas por 10 minutos a -20°C, e centrifugadas a 7000rpm e a 4°C por 10 minutos. Se necessário as amostras foram diluídas com NaCl 0,9%. Foi utilizado 40  $\mu$ L de amostra e 10  $\mu$ L de tampão de amostra que foram fervidos por 10 minutos a 100°C. Foram adicionados 5  $\mu$ L do padrão de massa molecular *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad) e 15  $\mu$ L de amostra em cada poço do gel.

A eletroforese foi feita com o gel em concentração de 10%. A tabela 9 mostra os reagentes utilizados e suas quantidades para a preparação dos géis de separação e empilhamento. O gel de separação é feito primeiro, e após sua solidificação é aplicado o gel de empilhamento

**Tabela 9-** Reagentes utilizados no preparo do gel de poliacrilamida 10% com 1mm de espessura:

<b>Espessura do Gel: 1mm</b>	<b>Gel de Separação</b>	<b>Gel de empilhamento</b>
Concentração:	10%	4%
Sol. acrilamida 30%, bisacrilamida 0,8%	1,67 mL	325 µL
Tampão Tris-HCl 1,5M, SDS 0,4%, pH 8,8 (4x)	1,25 mL	-
Tampão Tris-HCl 0,5M, SDS 0,4%, pH 6,8 (4x)	-	0,625 mL
H2O Milli Q	2 mL	1,5 mL
APS 10%	50 µL	25 µL
Temed	7,5 µL	5 µL
Volume Total	5 mL	2,5 mL

Fonte: Própria autora

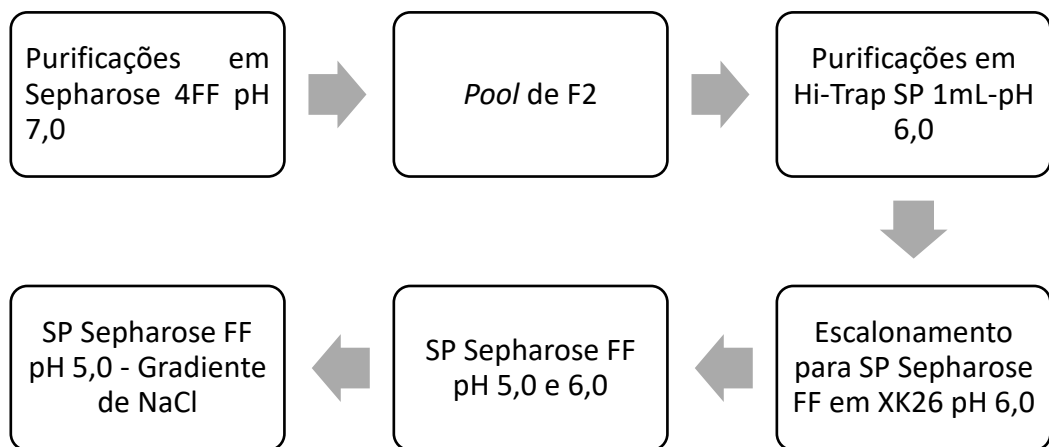
O sistema para corrida dos géis foi o *Mini- PROTEAN® Tetra Cell* e a fonte para a eletroforese *PowerPac HC power supply*, ambos da Bio-Rad, todos os géis correram inicialmente em 90V por 15 minutos e em 180V por cerca de 50 minutos a 1 hora.

Os géis foram corados sob agitação com corante Coomassie Brilliant Blue (sulfato de alumínio 5%, ácido fosfórico 2%, etanol 10%, Coomassie G250 0,02%), e descorado sob agitação com descorante (etanol 10%, ácido orto fosfórico 2%).

## 4. RESULTADOS

Neste trabalho foi estudada a purificação de IgM utilizando coluna de troca catiônica. Inicialmente foram feitas duas purificações em resina 4FF Sepharose, e as frações F2 coletadas em cada purificação foram reunidas e aliqüotadas para serem utilizadas nas purificações com a resina de troca catiônica. O *pool* de F2 obtido foi purificado inicialmente em Hi-Trap SP FF de 1mL. Foram testadas como amostras de entrada F2 sem diluição, diluído 5 vezes e diluído 10 vezes. Em seguida realizamos experimentos em coluna SP Sepharose FF. Avaliamos a purificação em pH 6,0 e em pH 5,0 e a eluição em gradiente salino (Figura 11).

**Figura 11-** Esquema das purificações realizadas neste trabalho.



Fonte: Própria autora

### 4.1 Purificação em Sepharose 4FF

Foram realizadas duas purificações em Sepharose 4FF, e ao final foi formado um *pool* com a fração F2 de cada uma delas. Nas duas purificações foram aplicados à coluna 235mL (0,2 VC) de plasma, que resultaram de três frações F1, F2 e F3.

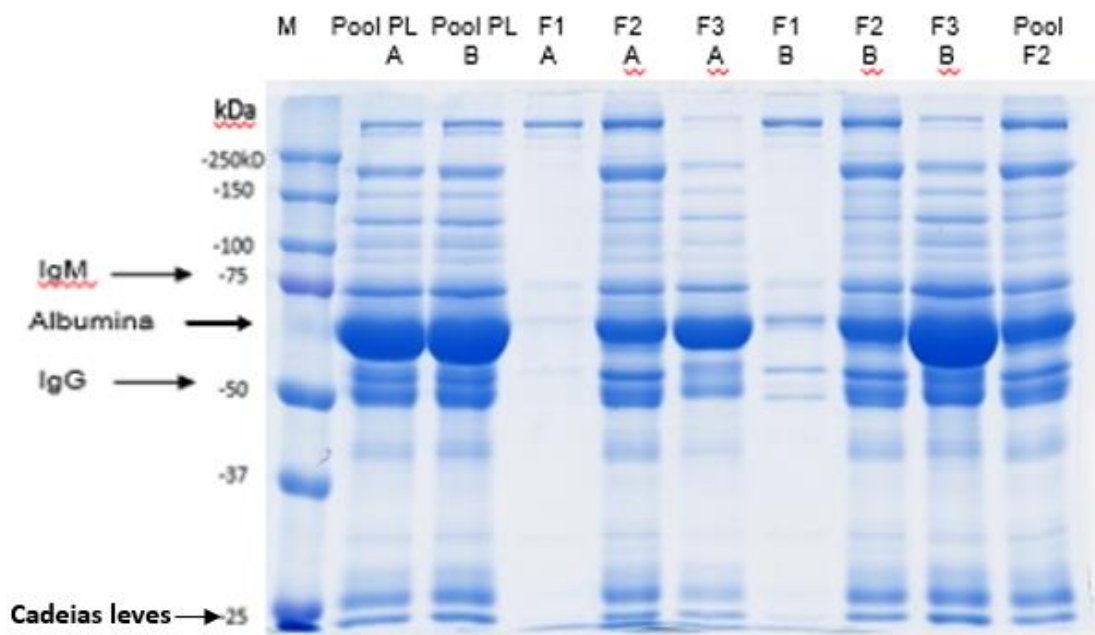
A concentração média de proteína no F2, que é a fração enriquecida de IgM, das duas purificações é de 7,3 mg/mL de proteína.

Na dosagem de IgM observamos que aproximadamente metade do IgM presente no plasma foi recuperado na fração F2. Essa purificação já foi realizada anteriormente

no laboratório e já se conhecia o fato de que a fração F2 era a mais rica em IgM, e o resultado obtido está de acordo com essa observação.

Na figura 12 está o gel de poliacrilamida da purificação onde pode-se observar que o perfil de todas as frações, estão de acordo com as purificações realizadas anteriormente.

**Figura 12-** Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações das purificações de plasma em Sepharose 4FF.



Fonte: Própria autora

*Legenda:* Canaletas: M- marcador de massa molecular; Pool de PL A- pool de plasma utilizado como amostra de entrada na purificação A (0,94 $\mu$ g); Pool de PL B- pool de plasma utilizado como amostra de entrada na purificação B (0,94 $\mu$ g); F1A= fração da purificação A (3  $\mu$ g); F2A= fração da purificação A (2,44  $\mu$ g); F3A= fração da purificação A (2,33  $\mu$ g); F1B= fração da purificação B (3 $\mu$ g); F2B= fração da purificação B (2,44  $\mu$ g); F3B= fração da purificação B (2,33  $\mu$ g); Pool de F2- pool feito com o F2 das purificações A e B (2,44  $\mu$ g)

#### 4.2 Purificação em Hi-Trap SP FF

Foram feitas 3 purificações em Hi-Trap SP FF, em todas foram aplicados 3mL de F2.

As purificações em Hi-Trap SP FF foram realizadas com o objetivo de verificar a afinidade de IgM pela coluna em diferentes concentrações de sal antes de escalonar.

A concentração de proteínas nas frações coletadas na purificação empregando F2 sem diluição estão mostradas na Tabela 10, com F2 diluído 5x na Tabela 11 e com F2 diluído 10 vezes na tabela 12.

**Tabela 10-** Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação de F2 sem diluição em Hi-Trap SP FF, segundo o método de Bradford

<b>Amostra</b>	<b>Volume da Fração (mL)</b>	<b>Concentração de Proteína (mg/mL)</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>Recuperação em relação a amostra de entrada (%)</b>
F2	3	3,907	11,72	100
FT	5	6,528	32,64	278,4
Reeq	6,4	0,013	0,08	0,7
Eluição 1	3	0,096	0,29	2,4
Eluição 2	6,2	0,009	0,05	0,4

Fonte: Própria autora

**Tabela 11-** Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação de F2 5 vezes diluída em Hi-Trap SP FF, segundo o método de Bradford

<b>Amostra</b>	<b>Volume da Fração (mL)</b>	<b>Concentração de Proteína (mg/mL)</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>Recuperação em relação a amostra de entrada (%)</b>
<i>F2</i>	15	0,744	7,440	100
<i>FT</i>	15	0,579	2,894	38,9
<i>Reeq</i>	7,5	0	0	0,0
<i>Eluição 1</i>	3	0,638	0,638	8,6
<i>Eluição 2</i>	6	0	0	0,0

Fonte: Própria autora

**Tabela 12-** Determinação da concentração de proteínas nas frações da purificação de F2 10 vezes diluída em Hi-Trap SP FF, segundo o método de Bradford

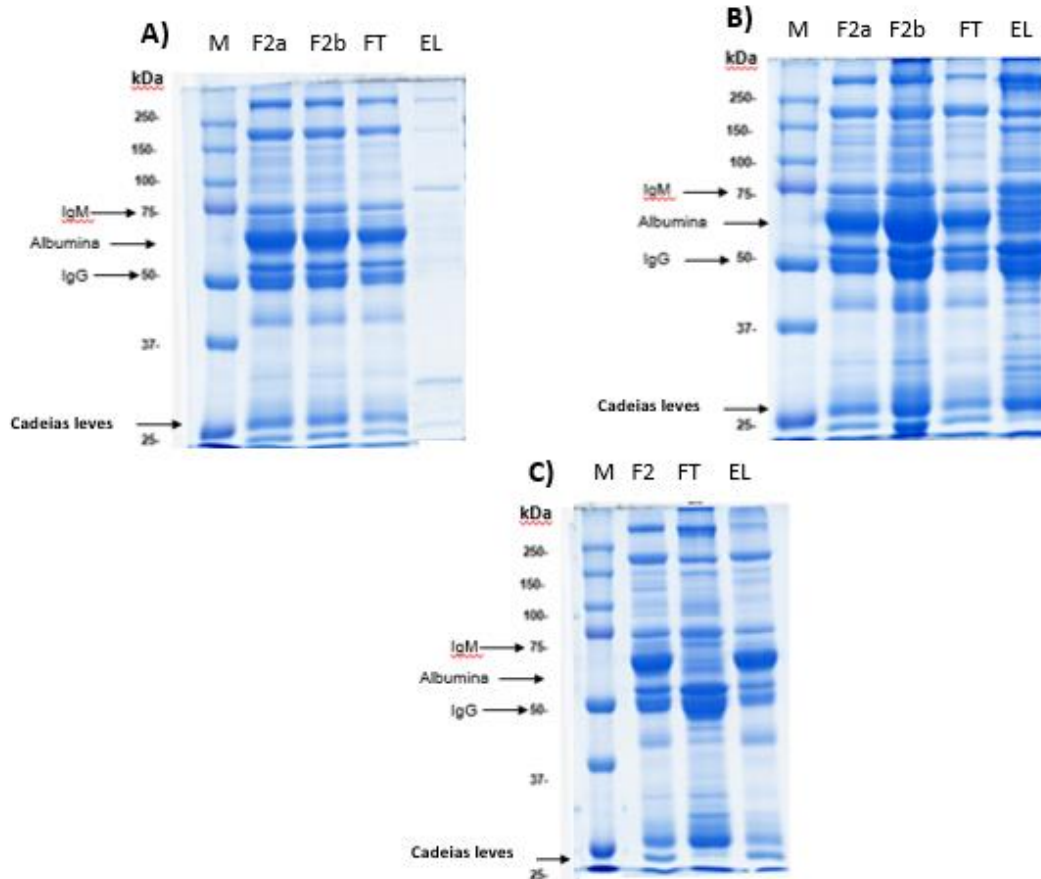
Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Recuperação em relação a amostra de entrada (%)
F2	30	12,70	38,09	100
FT	23	1,05	24,24	63,6
Reeq	9	0,24	2,20	5,8
Eluição 1	4,5	1,13	5,10	13,4
Eluição 2	5	0,25	1,24	3,3

Fonte: Própria autora

Nas 3 purificações foram aplicadas na coluna a mesma quantidade de proteínas. Considerando os resultados obtidos, a quantidade de proteínas aplicada na coluna foi em média 9,6 mg (calculada a partir dos valores apresentados nas Tabelas 10 e 11). Portanto, a quantidade de proteína aplicada à coluna mostrado na Tabela 12 deve estar superestimada. Analisando-se as frações de eluição observamos que resultados mostrados na Tabela 10 indicam que as proteínas não foram adsorvidas na coluna empregando F2 sem diluição (Tabela 10). A Tabela 11 mostra que uma pequena quantidade de proteínas foi adsorvida (0,64 mg) empregando F2 diluída 5 x e que 5,1 mg de proteína foi adsorvida empregando-se F2 diluída 10 x.

Na figura 13 estão representadas as análises em gel de poliacrilamida das purificações. A partir do gel C é possível observar que IgG encontra-se na eluição e a albumina no FT, portanto IgG liga-se mais fortemente a resina do que albumina em pH 6,0.

**Figura 13-** Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações das purificações em Hi-Trap SP F. (A) F2 sem diluição



Fonte: Própria autora

Legenda: Canaletas: M- marcador de massa molecular; F2a- amostra de entrada (7,8 $\mu$ g); F2b- amostra de entrada (6,49 $\mu$ g); FT: flow through (13,07  $\mu$ g); EL- eluição (0,24  $\mu$ g). (B): F2 diluído 5 vezes: M- marcador de massa molecular; F2a- amostra de entrada (0,179  $\mu$ g); F2b- amostra de entrada (17,85 $\mu$ g); FT: flow through (15,31 $\mu$ g); EL: eluição (13,89 $\mu$ g); (C) F2 diluído 10 vezes: F2- amostra de entrada (14,57 $\mu$ g); EL- eluição (15,54 $\mu$ g); FT- flow through (36,24 $\mu$ g)

#### 4.3 Purificação de F2 em SP Sepharose FF pH 6,0- 714mL

As purificações em Hi-Trap SP FF indicaram que a purificação em que diluímos o F2 10X foi a que apresentou a maior quantidade de proteína adsorvida na coluna. Assim, realizamos inicialmente a purificação empregando F2 diluído 10x em coluna de 23mL.

Foram aplicados 714mL de F2 num fluxo de 25mL/min. Foram recolhidos 790mL de FT.



Os resultados obtidos no teste de Bradford que estão apresentados na tabela 13, mostram que foram adsorvidos 35,3 mg de proteína na coluna, mas praticamente toda proteína aplicada saiu no FT.

**Tabela 13-** Determinação da concentração de proteína nas frações da purificação empregando F2 diluído 10 vezes em SP Sepharose FF.

Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Recuperação em relação a amostra de entrada (%)
F2 (10x dil)	714	0,577	412,2	100
FT	790	0,468	365,1	88,6
Reeq	172	0,007	1,3	0,3
Eluição 1	63	0,560	35,3	8,6
Eluição 2	36	0,076	2,7	0,7

Fonte: Própria autora

As dosagens de IgM, IgG e IgA estão apresentadas nas tabelas 14,15 e 16. Os resultados obtidos indicam que as três proteínas foram recuperadas no FT.

**Tabela 14-** Dosagem de IgM na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF

Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração IgM(mg/mL)	IgM (mg)	Recuperação de IgM (%)	Proteína Total (mg)	Conteúdo Específico (mg IgM/mg proteína)	Fator de Purificação
F2 (10X) 13/23	714	0,055	39,227	100	412,2	0,095	1,00
Ft- 13/23	790	0,046	35,551	90,6	365,2	0,097	1,02
Reeq- 13/23	172	0	0	0,0	1,3	-	-
Eluição 1 13/23	63	0,104	6,528	16,6	35,3	0,185	1,90
Eluição 2 13/23	36	0,019	0,697	1,8	2,7	0,254	2,61
Total			42,77	109,0			

Fonte: Própria autora

**Tabela 15-** Dosagem de IgG na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF

Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração IgG(mg/mL)	IgG (mg)	Recuperação de IgG (%)	Proteína Total (mg)	Conteúdo Específico (mg IgG/mg proteína)	Fator de Purificação
F2 (10X) 13/23	714	0,192	137,38	100,0	412,2	0,333	1,00
Ft- 13/23	790	0,150	117,09	85,2	365,2	0,321	1,0
Reeq- 13/23	172	0	0	0,0	1,3	0,000	0,0
Eluição 1 13/23	63	0,556	35,03	25,5	35,3	0,993	3,0
Eluição 2 13/23	36	0,133	4,80	3,5	2,7	1,750	5,3
<i>Total</i>			156,96	114,23			

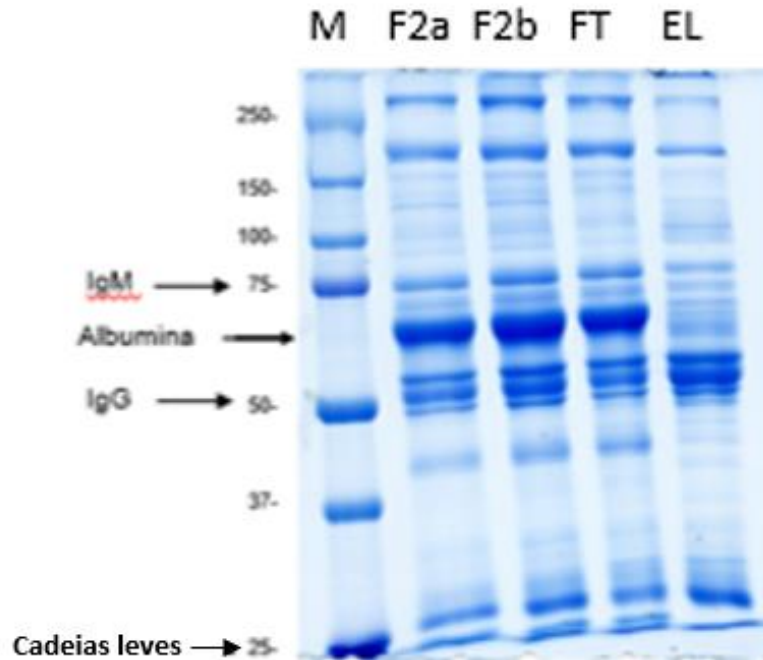
Fonte: Própria autora

**Tabela 16-** Dosagem de IgA na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF

Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração IgA(mg/mL)	IgA (mg)	Recuperação de IgA (%)	Proteína Total (mg)	Conteúdo Específico (mg IgA/mg proteína)	Fator de Purificação
F2 (10X) 13/23	714	0,120	85,41	100,0	412,2	0,207	1,00
Ft- 13/23	790	0,103	80,69	94,5	365,2	0,221	1,07
Reeq- 13/23	172	0,001	0,18	0,2	1,3	0,140	0,67
Eluição 1 13/23	63	0,130	8,22	9,6	35,3	0,233	1,12
Eluição 2 13/23	36	0,066	2,37	2,8	2,7	0,863	4,17
<i>Total</i>			91,45	107,1			

Fonte: Própria autora

**Figura 14-** Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações da purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF com 714mL de entrada. Canaletas: M- marcador de massa molecular; F2a- amostra de entrada (11,9 $\mu$ g); F2b- amostra de entrada diluída 10x (13,9 $\mu$ g); FT: flow throug (11,23 $\mu$ g), EL: eluição (13,44 $\mu$ g)



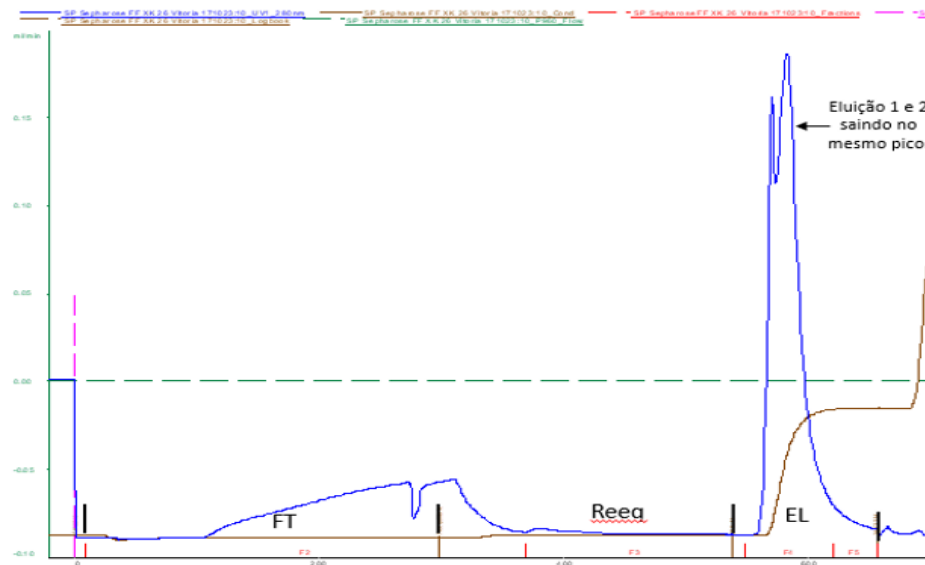
Fonte: Própria autora

#### 4.4 Purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF pH 5,0- 300mL

A fim de aumentar a quantidade de proteína adsorvida realizamos uma purificação em pH 5,0

A Figura 15 mostra o cromatograma da purificação. Observamos que a partir de 100mL de amostra de entrada proteínas começam a eluir no FT, indicando que a partir desse volume a coluna já estava saturada. Dessa forma nas purificações subsequentes realizamos as purificações em pH 5,0 e 6,0 aplicando 100mL de amostra.

**Figura 15-** Cromatograma purificação de F2 diluído SP Sepharose FF, pH 5,0



Fonte: Própria autora

O resultado do teste de Bradford (Tabela 17), aplicando-se 300mL de amostra, indica que, mais da metade das proteínas foram adsorvidas e foram coletadas na Eluição. Dos 96% de proteínas recuperadas 59% foram adsorvidos.

**Tabela 17-** Determinação da concentração de proteína nas frações da purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, pH 5,0.

Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Recuperação em relação a amostra de entrada (%)
F2 (10x dil)	300	0,531	159,4	100
FT	380	0,145	54,9	34,5
Reeq	182	0,021	3,9	2,5
Eluição 1	111	0,852	94,6	59,3
<b>Total</b>	-	-	153,4	96,2

Fonte: Própria autora

Nas imunoturbidimetrias (Tabelas 18,19 e 20) é possível observar que IgM ficou uma parte adsorvida e outra parte não adsorveu na coluna, ou seja, dos 102%

recuperados de IgM, 58,4% ficaram no FT e 44,2% ficaram na Eluição, o que já indica que a estratégia para adsorver mais proteínas na coluna deu certo. Dos 68,15% de IgG recuperados, 47,8 foram adsorvidos. A IgA dos 118% recuperados 60% estavam no FT.

**Tabela 18-** Dosagem de IgM na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, pH 5,0

Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração IgM(mg/mL)	IgM (mg)	Recuperação de IgM (%)	Proteína Total (mg)	Conteúdo Específico (mg IgM/mg proteína)	Fator de Purificação
F2 (10X) 13/23	300	0,040	12,10	100	159,4	0,076	1
Ft- 13/23	380	0,019	7,07	58,4	54,9	0,129	1,70
Reeq- 13/23	182	0	0,00	0,0	3,9	-	-
Eluição 13/23	111	0,048	5,35	44,2	94,6	0,057	0,75
<i>Total</i>			12,42	102,67			

Fonte: Própria autora

**Tabela 19-** Dosagem de IgG na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, pH 5,0

Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração IgG(mg/mL)	IgG (mg)	Recuperação de IgG (%)	Proteína Total (mg)	Conteúdo Específico (mg IgG/mg proteína)	Fator de Purificação
F2 (10X) 13/23	300	0,276	82,82	100	159,4	0,519	1
Ft- 13/23	380	0,015	5,84	7,05	54,9	0,106	0,20
Reeq- 13/23	182	0,060	10,98	13,25	3,9	2,808	5,41
Eluição 13/23	111	0,357	39,62	47,84	94,6	0,419	0,81
<i>Total</i>			56,44	68,15			

Fonte: Própria autora

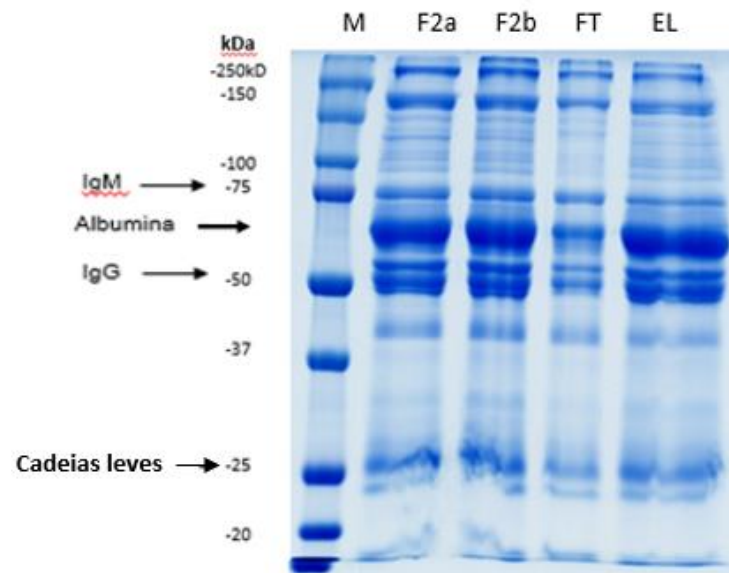
**Tabela 20-** Dosagem de IgA na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, pH 5,0

Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração IgA(mg/mL)	IgA (mg)	Recuperação de IgA (%)	Proteína Total (mg)	Conteúdo Específico (mg IgA/mg proteína)	Fator de Purificação
F2 (10X) 13/23	300	0,121	36,310	100,0	159,4	0,23	1
Ft- 13/23	380	0,058	22,023	60,7	54,9	0,40	1,76
Reeq- 13/23	182	0,035	6,448	17,8	3,9	1,65	7,24
Eluição 13/23	111	0,130	14,435	39,8	94,6	0,15	0,67
<i>Total</i>			43,0	118,2			

Fonte: Própria autora

A partir da análise do gel de poliacrilamida (Figura 16) é possível observar nas condições experimentais empregadas, parte da albumina foi adsorvida em comparação com a purificação em pH 6,0.

**Figura 16-** Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações da purificação de F2 diluída 10x em SP Sepharose FF com 300mL de entrada, pH 5,0.



Fonte: Própria autora

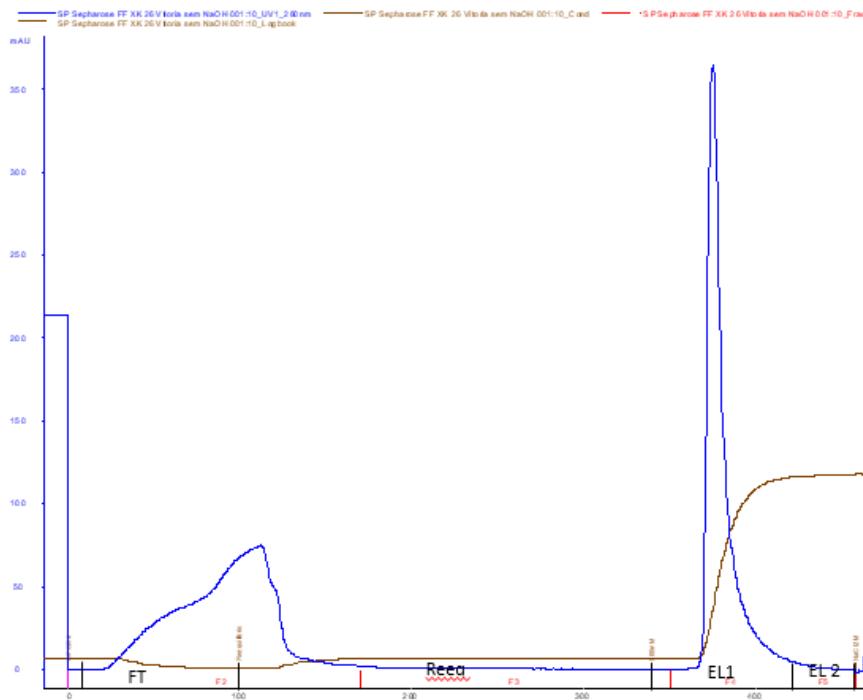
Legenda: Canaletas: M- marcador de massa molecular; F2a- amostra de entrada (12,86 $\mu$ g); F2b- amostra de entrada diluída 10x (12,74 $\mu$ g); FT: flow through (12,18 $\mu$ g); EL- eluição (13,63 $\mu$ g).

#### 4.5 Purificações de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF pH 5,0 e 6,0- 100mL de amostra

Na purificação anterior realizada em pH 5,0 observamos no cromatograma que parte das proteínas aplicadas foram adsorvidas a partir de 100mL foi observado a eluição de proteínas no FT, e por isso repetimos as purificações aplicando esse volume de amostra em pH 5,0 e pH 6,0.

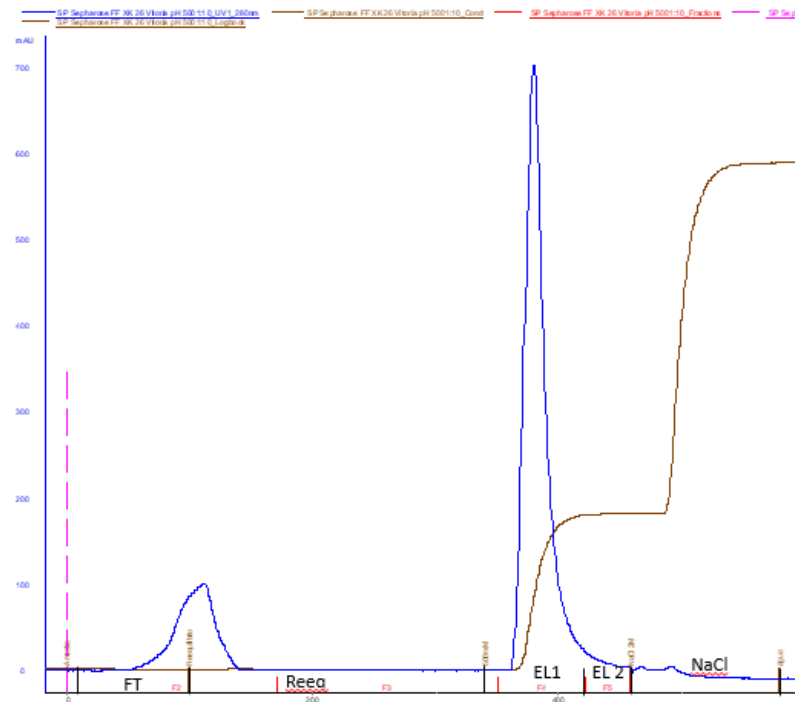
Nas figuras 17 e 18 estão apresentados os cromatogramas das purificações em pH 6,0 e pH 5,0, respectivamente. Observamos que o pico de eluição pH 5,0 é maior do que em pH 6,0, o que indica que mais proteínas são adsorvidas baixando pH.

**Figura 17-** Cromatograma da purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF com pH 6,0 e 100 mL de amostra de entrada.



Fonte: Própria autora

**Figura 18-** Cromatograma da purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF com pH 5,0 e 100 mL de amostra de entrada:



Fonte: Própria autora

Em pH 5,0 (Tabela 22) dos 86,0% de proteínas recuperadas 75,8% foram adsorvidas, e em pH 6,0 (Tabela 21) dos 83,7% de proteínas recuperadas 34,0% foi adsorvido na coluna. Esse resultado está de acordo com o visto no cromatograma, que em pH 5,0 mais proteínas são adsorvidas na coluna do que em pH 6,0.

**Tabela 21-** Determinação da concentração de proteína nas frações da purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, com 100mL de amostra de entrada e pH 6,0.

Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Recuperação em relação a amostra de entrada (%)
F2	100	0,363	36,270	100
FT 19/23	170	0,106	18,028	49,70
Reeq 19/23	190	0	0	0,00
Eluição 1 19/23	75	0,164	12,325	33,98
Eluição 2 19/23	37	0	0	0,00
<b>Total</b>		-	30,35	83,69

Fonte: Própria autora



**Tabela 22-** Determinação da concentração de proteína nas frações da purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, com 100mL de amostra de entrada e pH 5,0.

Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Recuperação em relação a amostra de entrada (%)
F2	100	0,712	71,24	100
FT 19/23	170	0,043	7,32	10,27
Reeq 19/23	190	0	0	0,00
Eluição 1 19/23	75	0,700	52,51	73,71
Eluição 2 19/23	37	0,039	1,45	2,04
NaCL 2M 19/23	68	-0,003	-0,20	0,00
<b>Total</b>		-	61,29	86,03

Fonte: Própria autora

Na purificação em pH 6,0 (Tabela 23), 51% de IgM foi recuperado na Eluição com fator de purificação de 0,7 e 35,6% foi recuperado no FT com fator de purificação 3,5. Portanto, em pH 6,0, embora a recuperação no FT tenha sido menor do que na eluição, o fator de purificação de 3,5, indica é melhor recuperar a IgM a partir do FT. Por outro lado, IgG foi totalmente adsorvido a coluna (Tabela 24). Não foi possível observar IgA nas frações coletadas na purificação.

Em pH 5,0 (Tabela 25), IgM foi recuperado somente na eluição, porém o rendimento foi muito baixo (38,4%) com um fator de purificação de 0,5. Desta forma vamos verificar se utilizando um gradiente de NaCl será possível aumentar a pureza de IgM. A recuperação total de IgG, considerando as proteínas adsorvidas (9%) e não adsorvidas (20%), foi muito baixa. Esse resultado indica que a quantidade de proteína não adsorvidas é maior do que as adsorvidas. Interessantemente a recuperação total de IgA foi muito alta (192%) dos quais 118% estavam no FT e 72% na Eluição indicando que a maior parte de IgA não estavam adsorvidas. Os resultados apresentados indicam que IgM tem a tendência de ser adsorvido a coluna, enquanto IgG e IgA tem a tendência de não serem adsorvidos a coluna. Esses resultados são preliminares e precisam ser repetidos.

**Tabela 23-** Dosagem de IgM na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, pH 6,0.

Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração IgM(mg/mL)	IgM (mg)	Recuperação de IgM (%)	Proteína Total (mg)	Conteúdo Específico (mg IgM/mg proteína)	Fator de Purificação
F2	100	0,035	3,47	100	71,24	0,05	1
FT 19/23	170	0,007	1,24	35,58	7,32	0,17	3,4631
Reeq 19/23	190	0,001	0,15	4,42	0	-	0
Eluição 1 19/23	75	0,023	1,76	50,58	52,51	0,03	0,6862
Eluição 2 19/23	37	-0,001	-0,03	0,00	1,45	-	0
<i>Total</i>			3,17	90,6			

Fonte: Própria autora

**Tabela 24-** Dosagem de IgG na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, pH 6,0.

Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração IgG(mg/mL)	IgG (mg)	Recuperação de IgG (%)	Proteína Total (mg)	Conteúdo Específico (mg IgG/mg proteína)	Fator de Purificação
F2	100	0,077	7,67	100	71,24	0,1077	1
FT 20/23	170	0	0,00	0,00	7,32	0,0000	0
Reeq 20/23	190	0	0,00	0,00	0,00	0,0000	0
Eluição 1 20/23	75	0,067	5,03	65,53	52,51	0,0957	0,8889
Eluição 2 20/23	37	0,014	0,51	6,62	1,45	0,3494	3,2442
NaCl 2M 20/23	68	-0	0,00	0,00	0,00	0,0000	0,0
<i>Total</i>			5,54	72,15			

Fonte: Própria autora

**Tabela 25-** Dosagem de IgM na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, pH 5,0.

Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração IgM(mg/mL)	IgM (mg)	Recuperação de IgM (%)	Proteína Total (mg)	Conteúdo Específico (mg IgM/mg proteína)	Fator de Purificação
F2	100	0,298	29,77	100	71,24	0,4179	1
FT 20/23	170	0	0	0,00	7,32	0	0
Reeq 20/23	190	0	0	0,00	0	0,0000	0,000
Eluição 1 20/23	75	0,152	11,44	38,41	52,51	0,2178	0,5211
Eluição 2 20/23	37	0	0	0,00	1,45	0	0,0000
NaCl 2M 20/23	68	0	0	0,00	0	0,0000	0
<b>Total</b>			11,44	38,41			

Fonte: Própria autora

**Tabela 26-** Dosagem de IgG na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, pH 5,0.

Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração IgG(mg/mL)	IgG (mg)	Recuperação de IgG (%)	Proteína Total (mg)	Conteúdo Específico (mg IgG/mg proteína)	Fator de Purificação
F2	100	0,069	6,90	100	71,24	0,097	1
FT 19/23	170	0,008	1,40	20,31	7,32	0,191	1,9772
Reeq 19/23	190	0	0,00	0,00	-5,22	0,000	0,0000
Eluição 1 19/23	75	0,008	0,62	8,96	52,51	0,012	0,1216
Eluição 2 19/23	37	0	0,00	0,00	1,45	0,000	0,0000
<b>Total</b>			2,02	29,28			

Fonte: Própria autora

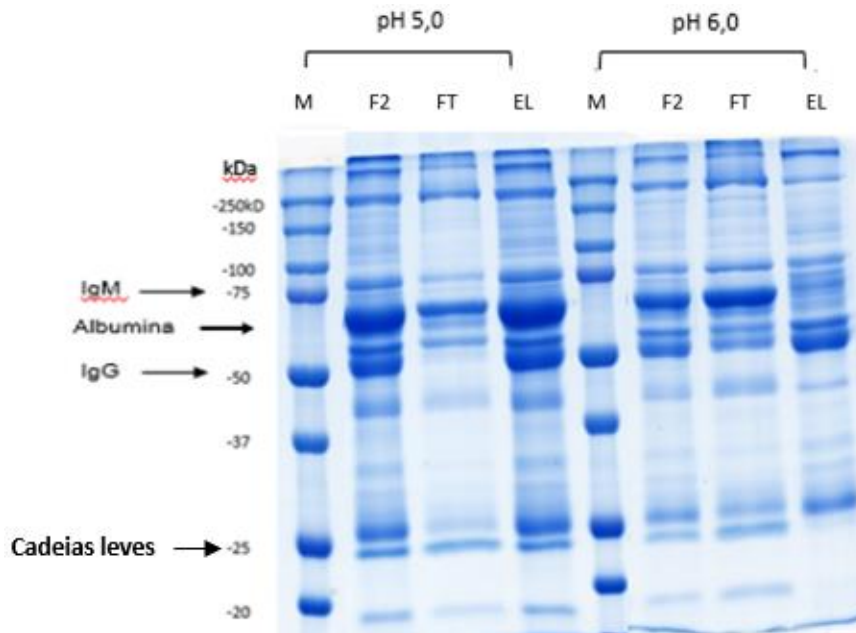
**Tabela 27-** Dosagem de IgA na purificação de F2 diluído 10x em SP Sepharose FF, pH 5,0.

Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração IgA(mg/mL)	IgA (mg)	Recuperação de IgA (%)	Proteína Total (mg)	Conteúdo Específico (mg IgA/mg proteína)	Fator de Purificação
F2	100	0,091	9,07	100,00	71,24	0,1273	1
FT 20/23	170	0,039	6,56	43,35	7,32	0,8968	7,05
Reeq 20/23	190	0,060	11,46	75,67	-5,22	0,0000	0,00
Eluição 1 20/23	75	0,099	7,45	49,21	52,51	0,1419	1,11
Eluição 20/23	37	0,043	1,59	10,50	1,45	1,0930	8,59
NaCl 2M 20/23	68	0,0299	2,04	13,44	-0,20	0,0000	0,00
<i>Total</i>			29,10	192,18			

Fonte: Própria autora

Na Figura 19 está apresentada a análise em gel de poliacrilamida das purificações. Em pH 6,0 a albumina eluiu no FT, e a IgG na eluição. Este resultado está de acordo com a imunoturbidimetria, em que IgG foi recuperado na Eluição com 72% de rendimento. Em pH 5,0 a albumina foi recuperada majoritariamente na fração de Eluição, enquanto a IgG também foi recuperada majoritariamente na Eluição, o que não está de acordo com a dosagem de IgG por imunoturbidimetria.

**Figura 19-** Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações das purificações em SP Sepharose FF com 100mL de entrada em pH 5,0 e 6,0.



Fonte: Própria autora

*Legenda:* Canaletas: M- marcador de massa; F2- amostra de entrada em pH 5,0 (14,30 $\mu$ g); FT- flow throug em pH 5,0 (26,72 $\mu$ g); EL= eluição em pH 5,0 (25,97 $\mu$ g); M- marcador de massa; 6: F2- amostra de entrada em pH 6,0 (14,13 $\mu$ g); FT= flow through em pH 6,0 (4 $\mu$ g); EL= eluição em pH 6,0 (13,72 $\mu$ g).

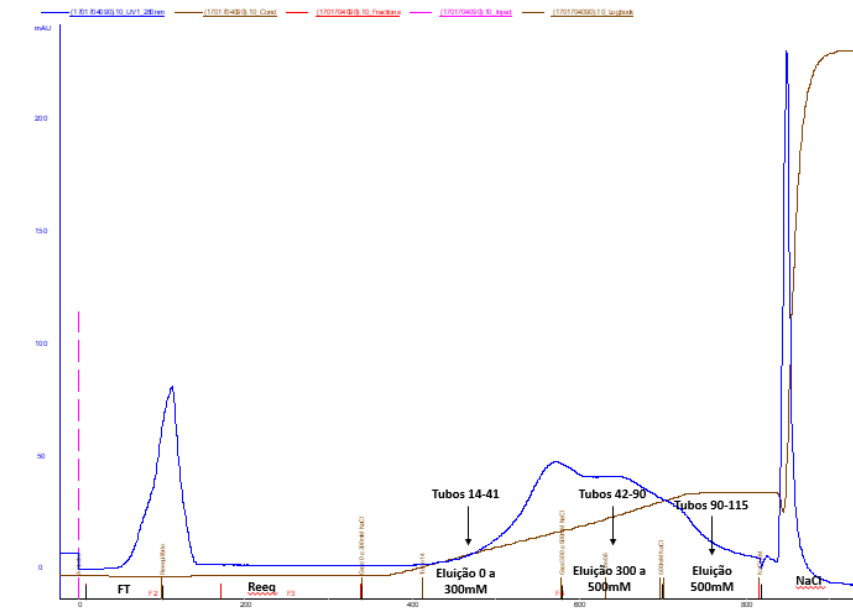
#### 4.6 Purificação de F2 em SP Sepharose FF com gradiente de NaCl

Nessa purificação foi realizado um gradiente de NaCl para a eluição das proteínas adsorvidas.

As frações coletadas foram FT, Reeq, NaCl e gradiente de NaCl. No gradiente as amostras foram coletadas de 5 em 5mL.

O cromatograma desta purificação esta mostrado na Figura 20.

**Figura 20** - Cromatograma de purificação SP Sepharose FF com gradiente de NaCl pH 5,0



Fonte: Própria autora

Através do teste de Bradford, mostrado na Tabela 28, é possível observar que 16% das proteínas estão no FT, 11% no Reequilíbrio, 23% até NaCl 300 mM, 36% entre NaCl 300 e 500mM. Somente 4,5% foi recuperado com NaCl 500 mM. O pico que eluiu com NaCl 2M não foi coletado inicialmente porque era uma fração de lavagem. O experimento foi repetido a fim de coletarmos essa fração. Observamos através do teste de Bradford que essa fração contém 19% das proteínas recuperadas.

**Tabela 28-** Determinação da concentração de proteína nas frações da purificação de F2 10x diluído em SP Sepharose FF com gradiente de NaCl, com 100mL de amostra de entrada e pH 5,0.

Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração de Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Recuperação (%)
F2	10	0,607	60,73	100
Ft	100	0,057	9,67	15,92
Reeq-	170	0,038	6,54	10,77
Eluição 0 a 300mM	173	-	13,67	22,50
Eluição 300 a 500mM	125	-	22,0	36,2
Eluição 500mM	110	-	2,74	4,50
NaCl 2M	120	0,099	11,36	18,70
<b>Total</b>			65,96	108,61

Fonte: Própria autora

Nas dosagens das imunoglobulinas por imunoturbidimetria (Tabelas 29 e 30) a porcentagem de recuperação dessas proteínas foi extremamente baixa, e isso pode estar associado ao fato de a quantidade de proteína recuperada estar abaixo do limite de detecção informado pelo fabricante dos testes (0,04mg/mL para IgM, 0,8mg/mL para IgG e 0,2mg/mL para IgA) mesmo reunindo as frações. Nesse contexto faremos uma análise preliminar que precisa ser confirmada posteriormente. Os resultados apresentados nas Tabelas 29 e 30 indicam que a IgM foi adsorvida mais fortemente que IgG porque está presente nas frações que eluem com a maior concentração de sal. A recuperação de IgA não pode ser avaliada porque não foi possível observar sua recuperação em nenhuma das frações coletadas.

**Tabela 29-** Recuperação de IgM na purificação SP Sepharose FF com gradiente de NaCl

Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração IgM(mg/mL)	IgM (mg)	Recuperação de IgM (%)	Proteína Total (mg)	Conteúdo Específico (mg IgM/mg proteína)	Fator de Purificação
F2	100	0,066	6,561	100	60,73	9,26	1
Ft	170	0,003	0,475	7,23	9,67	20,37	2,20
Eluição 14 -41	28	0	0,000	0,00	2,98	0	0,00
Eluição 42-90	49	0,050	2,445	37,27	7,08	2,90	0,31
NaCl 2M	115	0,008	0,923	14,07	11,36	12,30	1,33
Total			3,843	58,6			

Fonte: Própria autora

**Tabela 30-** Dosagem de IgG na purificação SP Sepharose FF com gradiente de NaCl

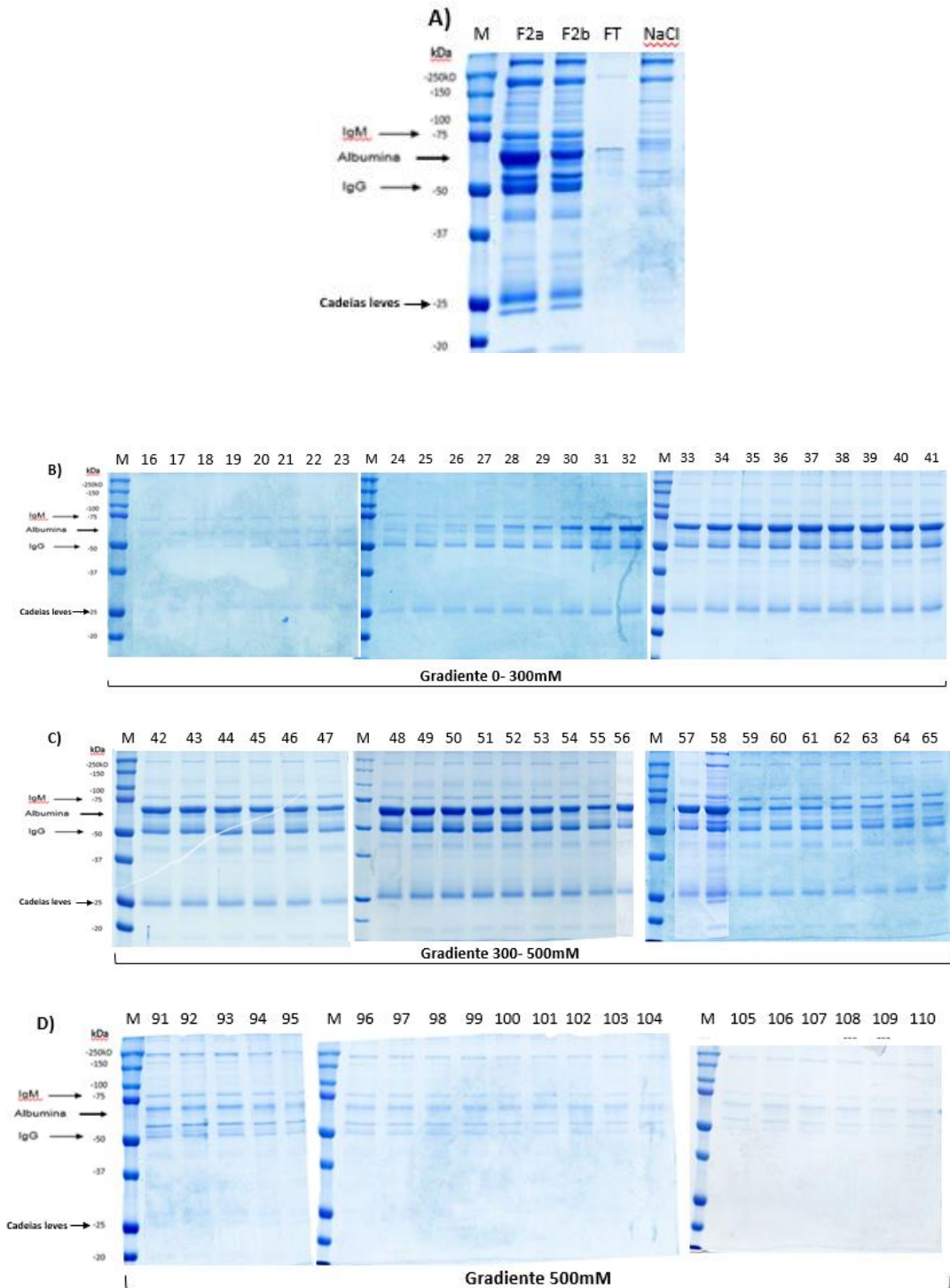
Amostra	Volume da Fração (mL)	Concentração IgG(mg/mL)	IgG (mg)	Recuperação de IgG (%)	Proteína Total (mg)	Conteúdo Específico (mg IgG/mg proteína)	Fator de Purificação
F2	100	0,2631	26,31	100	60,73	0,433	1
Ft	170	0	0	0,00	9,67	0,000	0,00
Eluição 14 -41	28	0,0369	1,03	3,93	2,98	0,347	0,80
Eluição 42-90	49	0,0250	1,22	4,66	7,08	0,173	0,40
NaCl 2M	115	0	0	0,00	11,36	0,000	0,00
Total			2,26	8,58			

Fonte: Própria autora

No gel de poliácridamida observamos que as frações que contém albumina são as mesmas que contém IgG (Figura 21).



**Figura 21-** Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações da purificação em SP Sepharose FF com gradiente de NaCl.



Fonte: Própria autora

Legenda: Canaletas: (A)= M- marcador de massa molecular; F2a- amostra de entrada (15,08 $\mu$ g); F2b- amostra de entrada diluída 10x (19,42 $\mu$ g); FT- flow through (9,1  $\mu$ g); NaCl- lavagem com NaCl 2M (15,84 $\mu$ g); (B)= gradiente 0 a NaCl 300mM (tubos 16 ao 41); (C)= gradiente NaCl 300mM a NaCl 500mM (tubos 42 ao 65); (D)= NaCl 500mM (tubos 91 ao 110).

## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos o uso de uma coluna de troca catiônica após a purificação de plasma em coluna de gel filtração Sepharose 4FF.

A fração F2 da Sepharose FF foi utilizada como amostra de entrada em todas as purificações deste trabalho.

Para avaliar a afinidade das proteínas de F2 em resina SP Sepharose FF iniciamos o trabalho aplicando o F2 com condutividades diferentes. Para tanto utilizamos três diluições diferentes como amostra de entrada.

Inicialmente empregamos a coluna Hi-Trap SP FF por ser uma coluna pequena e de fácil manuseio. Observamos que sem diluição do F2 as proteínas não são adsorvidas na coluna de troca catiônica, mas nas purificações empregando F2 diluída 5 vezes e 10 vezes não ficou claro se as proteínas eram ou não adsorvidas. Nas purificações seguintes ficou claro que a quantidade de amostra aplicada excedia a capacidade da coluna.

Tomando como base a quantidade de proteína adsorvida nas purificações empregando F2 diluída, utilizamos a diluição 10x nas purificações usando a coluna SP Sepharose FF de 23,8mL empacotada no nosso laboratório.

Somente quando reduzimos o volume da amostra de entrada para 100mL foi possível observar um perfil cromatográfico coerente. Considerando a concentração média de proteína em F2 de 6,34mg/mL, ao aplicarmos 100mL de F2 diluído 10x concluímos que a quantidade de proteína aplicada na coluna foi de aproximadamente 63mg. Iniciamos nosso estudo empregando pH 6,0 a fim de verificar se as proteínas da amostra F2 poderiam ser adsorvidas nesse pH. Com o resultado do teste de Bradford observamos que 50% de IgM foi adsorvido enquanto 35,5% foi recuperado no FT. Para aumentarmos a quantidade de proteínas adsorvidas realizamos também a purificação em pH 5,0. Nesse pH IgM foi recuperado somente na fração de Eluição. Mesmo tendo recuperado uma quantidade muito baixa de IgM na fração de Eluição, realizamos o gradiente salino para verificar se seria possível aumentar a pureza desta imunoglobulina. Os resultados das amostras das frações coletadas no gradiente estavam muito diluídas e dificultaram a análise da purificação.

Para obter resultados mais confiáveis será necessário realizar purificações numa coluna de volume maior. Os resultados obtidos em coluna de troca catiônica poderão então ser comparados aos obtidos em coluna de troca aniônica já realizados pelo

nosso laboratório. É interessante observar que na literatura não estão descritas purificações de IgM em coluna de troca catiônica.

Até o momento não é do nosso conhecimento trabalhos na literatura que descrevem a purificação de IgM empregando cromatografia de troca catiônica. Devido ao tamanho de 950 kDa estão descritos principalmente trabalhos empregando cromatografia de gel filtração e precipitação com sulfato de amônio ou a combinação destes métodos (Tabela 4). Mais recentemente encontramos trabalhos empregando cromatografia de troca aniônica (Tabela 4). Entretanto, estes trabalhos não visam a obtenção de IgM em escala comercial. Devido ao grande interesse em anticorpos monoclonais, encontramos métodos de purificação de IgM monoclonal (GAUTAN; LOH, 2011). É importante salientar que anticorpos monoclonais apresentam pontos isoelétricos (pIs) precisos, enquanto os anticorpos naturais apresentam uma faixa larga de pI, o que dificulta muito mais a sua purificação. Além disso, os meios em que estes anticorpos são produzidos são muito diferentes do sangue, requerendo estratégias diferentes de purificação. No nosso laboratório pretendemos desenvolver um processo de purificação de IgM, temos estudado 2 estratégias a partir de plasma humano empregando resinas industriais, que possibilitam o escalonamento (VERINAUD, 2016). Nessas estratégias avaliamos o uso de resinas de troca aniônica, gel filtração e cromatografia de afinidade a metal imobilizado. Devido a boa relação custo-benefício das resinas de troca iônica e de serem facilmente escalonadas, nesse trabalho avaliamos o uso de resinas de troca catiônica.

Até o momento não existe concentrado de IgM disponível comercialmente, somente o Pentaglobin que é um concentrado de imunoglobulinas enriquecido de IgM.

Finalmente cabe lembrar que a IgM obtida nas purificações é a IgM natural presente no sangue, diferente da IgM produzida pelo sistema imune no início da resposta imune.

## **6 CONCLUSÕES**

Foi possível ter a IgM adsorvida na coluna diminuindo-se a condutividade da amostra de entrada e o pH da purificação.

Os resultados obtidos são preliminares e ainda não permitem comparar a purificação em resina de troca catiônica com resina de troca aniônica.

## **7 PERSPECTIVAS**

Como empregando a diluição de F2 de 10x, albumina, IgG e IgM foram adsorvidas na coluna, pretendemos realizar a purificação empregando F2 diluído 5x para verificar se essas proteínas podem ser separadas.

Uma vez determinada a melhor diluição de F2 empregando gradiente de NaCl será necessário verificar a eluição com gradiente em degrau, uma vez que para se obter um processo de purificação não se usa gradiente linear.

## **REFERÊNCIAS**

ANVISA ,7º **Boletim de PRODUÇÃO HEMOTERÁPICA**, Hemoprod 2018, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/arquivos-noticias-anvisa/961json-file-1>

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

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

COVAS D.T. **Hemoderivados no Brasil**. Anexo 1, 2014. 22p. Disponível em: Hemoderivados\_Brasil\_2014.pages (al.sp.gov.br).

CYTIVA. **Sepharose 4 Fast Flow**. 2023. Disponível em: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/chromatography/resins/sizeexclusion/sepharose-4-fast-flow-p-05600>

FEDERICO Perosa, Raffaella Carbone, Soldano Ferrone, Franco Dammacco, **Purification of human immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and ammonium sulphate**, Journal of Immunological Methods, Volume 128, Issue 1,1990, Pages 9-16, ISSN 0022-1759, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(90\)90458-8](https://doi.org/10.1016/0022-1759(90)90458-8).

FELIZ, M. et al. **Hemocomponentes e Hemoderivados**,2021, [s.l: s.n.]. Disponível em:[https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/52782/1/MICF\\_Mafalda\\_Cruz.pdf](https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/52782/1/MICF_Mafalda_Cruz.pdf)

GAUTAN S, LOH KC. **Immunoglobulin-M purification--challenges and perspectives. Biotechnol Adv.** 2011 Nov-Dec;29(6):840-9. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.001. Epub 2011 Jul 7. PMID: 21762771.

JACOBIN MJ, Santarelli X, Laroche-Traineau J, Clofent-Sanchez G. **Production of a human monoclonal IgM directed against human cardiac myosin in a hollow-fiber bioreactor for membrane anion exchange chromatography one-step purification. Hum Antibodies.** 2004;13(3):69-79. PMID: 15598987.

JEHANLI A, Hough D. **A rapid procedure for the isolation of human IgM myeloma proteins. J Immunol Methods.** 1981;44(2):199-204. doi: 10.1016/0022-1759(81)90347-1. PMID: 6792283.

JOHNSON RB Jr, Libby R. **Separation of immunoglobulin M (IgM) essentially free of IgG from serum for use in systems requiring assay of IgM-type antibodies without interference from rheumatoid factor. J Clin Microbiol.** 1980 Sep;12(3):451-4. doi: 10.1128/jcm.12.3.451-454.1980. PMID: 7217336; PMCID: PMC273607.

KRIDIN K, Ahmed AR. **Post-rituximab immunoglobulin M (IgM) hypogammaglobulinemia. Autoimmun Rev.** 2020 Mar;19(3):102466. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102466. Epub 2020 Jan 7. PMID: 31917267.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6ª Edição, 2014. Ed. Artmed, p. 89-92

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

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

MAYER, G.; HOPKINS, M. **IMUNOLOGIA -CAPÍTULO QUATRO IMUNOGLOBULINAS -ESTRUTURA E FUNÇÃO**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/HELIOJOSEMONTASSIER/ed-3-anticorpos-e-imunoglobulinas.pdf>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais (CRIE) 3a Edição**. Atualizado em: Setembro de 2023. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/ptbr/vacinacao/manuais/manual\\_centro\\_referencia\\_imunobiologicos-1.pdf/view](https://www.gov.br/saude/ptbr/vacinacao/manuais/manual_centro_referencia_imunobiologicos-1.pdf/view). Acesso em: 14 dez. 2023.

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

PADILLA, Osvaldo; ABADIE, Jude. **Exames de sangue: valores normais**. 2021. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/recursos/valores-laboratoriais-normais/exames-de-sangue-valores-normais>.

PATTISON JR, Mace JE. **The detection of specific IgM antibodies following infection with rubella virus**. J Clin Pathol. 1975 May;28(5):377-82. doi: 10.1136/jcp.28.5.377. PMID: 1150889; PMCID: PMC475715.

REDETEC. **Hemoderivados**,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)

ROGER Lindmark, Kerstin Thorén-Tolling, John Sjöquist, **Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera**, Journal of Immunological Methods, Volume 62, Issue 1,1983, Pages 1-13, ISSN 0022-1759, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90104](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90104)

SAMPSON IA, Hodgen AN, Arthur IH. **The separation of immunoglobulin M from human serum by fast protein liquid chromatography**. J Immunol Methods. 1984 Apr 13;69(1):9-15. doi: 10.1016/0022-1759(84)90271-0. PMID: 6425413.

SÃO PAULO, Fundação Pró-Sangue, Hemocentro. **Manual de Transfusão**, 2018. Disponível em: <https://www.prosangue.sp.gov.br/uploads/arquivos/MANUAL%20DE%20TRANSFUS%C3%83O%202018.pdf>.

SATYEN GAUTAM, KAI-CHEE LOH, Immunoglobulin-M purification — **Challenges and perspectives, Biotechnology Advances**, Volume 29, Issue 6, 2011, Pages 840-849, ISSN:07349750, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.001>.

SCHALLER, J; GERBER, S.; KÄMPFER, U.; LEJON, S.; TRACHSEL, C. **Human blood plasma proteins: structure and function**. Ed. John Wiley & Sons, 2008, p. 196-202

SCOTT, Cheryl and TSAI, Christina Pingchuan. **Cell-Line Development for Expressing IgM Antibodies**, 2022. Disponível em: <https://bioprocessintl.com/analytical/cell-line-development/cell-line-development-for-expressing-igm-antibodies/>.

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

TATUM AH. **Large scale recovery of biologically active IgM (95% pure) from human plasma obtained by therapeutic plasmapheresis**. J Immunol Methods. 1993 Jan 14;158(1):1-4. doi: 10.1016/0022-1759(93)90252-3. PMID: 8429210.

VERINAUD, Claudia Iwashita. **Desenvolvimento de duas estratégias de purificação de IgM a partir de plasma humano**. 2016. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. doi:10.11606/T.87.2016.tde-21102016-104835.