

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Engenharia Química  
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

# ADSORÇÃO DE IGE HUMANA A PARTIR DE AMOSTRAS SÉRICAS OU PLASMÁTICAS EM LECTINAS IMOBILIZADAS EM AGAROSE

**Eng<sup>a</sup> Isa Santos Duarte**  
Doutoranda

**Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Maria Alves Bueno**  
Orientadora

**Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner**  
Co-orientador

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas, SP  
Fevereiro de 2006

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

D85a Duarte, Isa Santos  
Adsorção de IgE humana a partir de amostras séricas ou plasmáticas em lectinas imobilizadas em agarose / Isa Santos Duarte.--Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadores: Sônia Maria Alves Bueno, Ricardo de Lima Zollner

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Imunoglobulina E. 2. Cromatografia de afinidade. 3. Proteínas - Purificação. 4. Lectinas. 5. Adsorção. 6. Alergia. 7. Lentilha. 8. Concanavalina A. I. Bueno, Sônia Maria Alves. II. Zollner, Ricardo de Lima. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Adsorption of human IgE from sera or plasma samples on lectins immobilized on agarose

Palavras-chave em Inglês: Imunoglobulin E, IgE, Concanavalin A, *Lens culinaris*, Lectin, Affinity Chromatography, Protein purification, Allergy, Adsorption

Área de concentração: Desenvolvimento de processos Biotecnológicos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora: Adalberto Pessoa Júnior, Maria Marluce dos Santos Vilela, Wirla Maria Silva Cunha Tamashiro, Everson Alves Miranda

Data da defesa: 10/02/2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Engenharia Química  
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

TESE DE DOUTORADO:

**Adsorção de IgE humana a partir de amostras séricas ou plasmáticas em lectinas imobilizadas em agarose, defendida pela engenheira química Isa Santos Duarte e aprovada em 10 de fevereiro de 2006 pela banca examinadora constituída pelos doutores:**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Maria Alves Bueno

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Maria Alves Bueno  
Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia Química

---

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior  
Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Marluce dos Santos Vilela  
Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Ciências Médicas

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Wirla Maria Silva Cunha Tamashiro  
Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Biologia

---

Prof. Dr. Everson Alves Miranda  
Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia Química

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida pela engenheira química Isa Santos Duarte e aprovada pela comissão julgadora em 10 de fevereiro de 2006.

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Maria Alves Bueno

À minha querida família.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus agradecimentos a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho e para meu crescimento intelectual durante o doutorado, em especial:

A Deus;

Ao meu pai Adilson e minhas mães Eva e Maroca, pelo incentivo e amor incondicional;

Ao amado e companheiro Marco;

Aos professores Sônia Bueno e Ricardo Zollner pela orientação e pela confiança;

Aos órgãos de fomento CNPq, FAPESP e FAEPEX, pelo indispensável apoio financeiro;

Às colegas Kiki, Érika, Geórgia e Conceição, pela amizade e pelas doações de sangue ao banco de soros;

Aos colegas de laboratório Ana Paula, Adriana, Alessandra, Carol, Cristiane, Érika, Fabiana, Geórgia, Gisele, Goran, Igor, Ivanildo, Leonardo, Moisés, Marina, Neemias, Paula Marreco, Paula Timoteo, Romi, Alexandre Tashima, Vinícius, pela amizade e cooperação no laboratório;

Em especial às amigas e companheiras de “bancada” Luciana Aquino e Mariana Borsoi, pela amizade e apoio;

Ao colega João Paulo, pela amizade e pela cooperação nas análises de HPLC;

Às colegas do Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental Conceição, Fabíola e Karla, pela amizade e pela valiosa ajuda nas análises de IgE e nos experimentos de “Immunoblotting”;

Aos colegas do Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental Bruna, Carina, Leonardo, Maira, Margarida, Priscila, Rúbia, Thiago, pela amizade e cooperação;

Aos professores Everson Miranda, Ângela Moraes, Maria Helena Santana e César Santana por cederem equipamentos e reagentes de seus laboratórios;

Aos demais alunos, professores e funcionários da FEQ/UNICAMP;

Aos professores Everson Miranda, Wirla Tamashiro e Maria Helena Santana, pelas valiosas dicas nos exames de qualificação;

Ao professor Lisbôa, pela amizade e pelo apoio em língua inglesa;

Ao colega Marco Antônio Moda do Laboratório de Patologia Clínica do HC/UNICAMP, pelo apoio e cooperação;

A todos os colegas, professores e funcionários da UNICAMP que de alguma forma contribuíram para o andamento do trabalho.

A todos meus amigos espalhados por este Brasil, pela amizade e incentivo.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”  
(Cora Coralina)



## RESUMO

A alergia é uma enfermidade do sistema imunológico que afeta aproximadamente de 20 a 30% da população mundial. Dentre as reações alérgicas, a reação de hipersensibilidade imediata é mediada pelas imunoglobulinas E (IgE). Os indivíduos geneticamente predispostos a manifestar reações por hipersensibilidade imediata e polissensibilizados aos alérgenos ambientais são considerados atópicos e, geralmente, possuem teores de IgE total até 10.000 vezes mais elevados do que as pessoas não-atópicas. O conhecimento das interações entre a IgE e ligantes de afinidade pode levar ao desenvolvimento de novos tratamentos da hipersensibilidade imediata, por exemplo a terapia de adsorção seletiva através de circulação extracorpórea, assim como ao desenvolvimento de métodos de obtenção de IgE purificada, para aplicação nas áreas de diagnóstico, pesquisa molecular, dentre outras. Os adsorventes empregados na terapia de adsorção seletiva, bem como na purificação de IgE, geralmente são anticorpos anti-IgE imobilizados em agarose, os quais são de alto custo e difícil obtenção. Este trabalho avaliou o desempenho de adsorventes alternativos ao Sepharose-anti-IgE, visando a remoção de IgE total e específica aos ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* de amostras plasmáticas e a preparação de soluções enriquecidas em IgE, como uma das etapas do processo de purificação de IgE. Os adsorventes estudados constituíram-se de lectinas (concanavalina A e *Lens culinaris*), aminas (poli-L-lisina e amino-hexil) e o aminoácido D-triptofano, imobilizados em agarose. Dentre eles, o gel agarose-*Lens culinaris* mostrou-se o mais promissor para aplicação na terapia de adsorção seletiva de IgE e o gel Sepharose-concanavalina A mostrou-se o mais adequado para ser usado na obtenção de soluções enriquecidas em IgE. Experimentos cromatográficos foram realizados visando estabelecer condições experimentais (velocidade superficial, número de passagens de plasma pela coluna, temperatura e razão entre volume de plasma e volume de leite) mais favoráveis à adsorção de IgE em agarose-*Lens culinaris*. Posteriormente, essas condições foram utilizadas nos experimentos de simulação *in vitro* de circulação extracorpórea, nos quais o gel agarose-*Lens culinaris* removeu de 40,7 a 42,8% de IgE's total e específicas. A obtenção da solução enriquecida em IgE foi realizada por meio de duas etapas cromatográficas, empregando-se os princípios de afinidade (colunas agarose-jacalina e Sepharose-concanavalina A) e de exclusão por tamanho (permeação em gel). A solução final enriquecida em IgE obtida, continha como principais impurezas, IgA e IgG. Como resultado das duas etapas, 36,6% de IgE foi recuperada e o fator de enriquecimento em IgE, em relação a IgA, IgG, IgM e albumina, foi de 75,8. Apesar do gel Sepharose-anti-IgE apresentar desempenho melhor tanto na remoção quanto na purificação de IgE, os adsorventes agarose-*Lens culinaris* e Sepharose-concanavalina A apresentam custos mais atrativos.

**Palavras-chave:** Imunoglobulina E, concanavalina A, *Lens culinaris*, lectina, afinidade, purificação, alergia.

## ABSTRACT

Allergy is a disorder of the immune system, affecting approximately 20%-30% of the general population. Among allergic reactions, immediate hypersensitivity is mediated by immunoglobulin E (IgE). Individuals that have a genetic predisposition for responses to immediate hypersensitivity are named atopic and generally have elevated serum IgE concentration, up to 10,000-fold higher than in the normal population. The knowledge of the interactions between IgE and affinity ligands may lead to the development of new methods of treatment for immediate hypersensitivity, for example, IgE selective adsorption therapy through extracorporeal circulation, as well as to new methods for obtaining purified IgE, which is employed in diagnostic and in molecular research. The adsorbents employed in IgE selective adsorption therapy, as well as in IgE purification, are usually antibodies anti-IgE immobilized on agarose, which have high costs and are difficult to obtain. This work assessed the performance of adsorbents (alternative to Sepharose-anti-IgE) for the removal of total IgE and IgE specific for the airborne allergens *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Blomia tropicalis* from plasma samples, as well as in the production of IgE enriched solutions, considered as a step of IgE purification. The adsorbents studied were lectins (concanavalin A and *Lens culinaris*), amines (poly-L-lisina e aminohehil) and the aminoacid D-tryptophan, all of them immobilized on agarose. Among them, *Lens culinaris*-agarose showed the best performance for IgE selective adsorption therapy, and Sepharose-concanavalin A was considered the most appropriate for the production of IgE enriched solutions. Chromatographic experiments were accomplished in order to determine operating conditions (superficial velocity, number of times the plasma passed through the column, temperature, and ratio of plasma volume to bed volume) more favorable to IgE adsorption on *Lens culinaris*-agarose. The selected conditions were utilized in *in vitro* simulation assays of extracorporeal circulation, in which the *Lens culinaris*-agarose removed from 40.7% to 42.8% of total and specific IgE. The production of IgE enriched solutions was carried out with two chromatographic steps, employing affinity (columns jacalin-agarose and Sepharose-concanavalin A) and size exclusion (gel permeation) principles. The IgE enriched final solution contained IgA and IgG as the major impurities. As a result of both steps, 36.6% of IgE was recovered and the IgE enrichment number concerning IgA, IgG, IgM, and albumin was 75.8. Despite Sepharose-anti-IgE has better performance in removal and purification of IgE, *Lens culinaris*-agarose and Sepharose-concanavalin A adsorbents have more attractive costs.

**Keywords:** Immunoglobulin E, concanavalin A, *Lens culinaris*, lectin, affinity, purification, allergy.

## SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE TABELAS	xvi
NOMENCLATURA	xviii
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVO	1
1.1. INTRODUÇÃO	1
1.2. OBJETIVO	4
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE IMEDIATA	5
2.2. IMUNOGLOBULINA E	7
2.3. TRATAMENTO PADRÃO DA HIPERSENSIBILIDADE I	8
2.4. TERAPIA DE ADSORÇÃO SELETIVA DE IgE ATRAVÉS DE CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA DO SANGUE	10
2.4.1. Princípio do tratamento extracorpóreo por adsorção seletiva de IgE	10
2.5. PURIFICAÇÃO DE IgE	12
2.6. LIGANTES DE AFINIDADE UTILIZADOS PARA PURIFICAÇÃO DE IgE E PARA REMOÇÃO DE IgE POR TRATAMENTO EXTRACORPÓREO	13
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. PLANO DE TRABALHO	18
3.2. MATERIAIS	19
3.2.1. Adsorventes	19
3.2.2. Amostras de soro e plasma humanos	20
3.2.3. Reagentes	20

3.3. MÉTODOS _____	21
3.3.1. Preparação das amostras de soro e plasma humanos _____	21
3.3.2. Caracterização das amostras séricas e plasmáticas _____	22
3.3.3. Dosagem das concentrações de IgG, IgA, IgM, albumina, C3 e C4 _____	23
3.3.4. Quantificação de IgE _____	24
3.3.5. Quantificação de proteínas totais _____	24
3.3.6. Experimentos de remoção de IgE em frascos agitados para seleção de adsorventes _____	25
3.3.7. Experimentos de consumo de C3 e C4 em frascos agitados para seleção de adsorventes _____	25
3.3.8. Experimentos cromatográficos de simulação de circulação extracorpórea _____	26
3.3.9. Eletroforese SDS-PAGE no equipamento Phast-System _____	30
3.3.10. Experimentos cromatográficos para obtenção de solução enriquecida em IgE _____	31
3.3.11. Diálise _____	34
3.3.12. Evaporação a vácuo _____	34
3.3.13. Análise microscópica de cristais _____	34
3.3.14. “Immunoblotting” _____	35
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	37
4.1. SELEÇÃO DE SUPORTES ALTERNATIVOS À AGAROSE-ANTI-IgE PARA ADSORÇÃO DE IgE _____	37
4.1.1. Critérios para seleção de adsorventes _____	37
4.1.2. Aplicação dos critérios para seleção de adsorventes _____	38
4.1.3. Capacidade de retenção dos suportes de afinidade _____	39
4.1.4. Seletividade dos suportes de afinidade _____	42
4.1.5. Estudos de consumo de C3 e C4 _____	45

4.2. SIMULAÇÃO DA CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA PARA REMOÇÃO DE IgE: EMPREGO DO GEL AGAROSE- <i>LENS CULINARIS</i> _____	47
4.2.1. Capacidade de adsorção e seletividade do gel agarose- <i>Lens culinaris</i> em modo contínuo _____	47
4.2.2. Efeito de variáveis operacionais na adsorção de IgE _____	50
4.2.3. Estudo de adsorção não específica entre IgE e Sepharose CL-4B _____	52
4.2.4. Influência de IgE total na adsorção das outras imunoglobulinas _____	52
4.2.5. Simulação <i>in vitro</i> de circulação extracorpórea para remoção de IgE _____	53
4.3. APLICAÇÃO DO GEL SEPHAROSE-CON A NA OBTENÇÃO DE SOLUÇÕES ENRIQUECIDAS EM IgE _____	54
4.3.1. Cromatografia de afinidade para obtenção de solução enriquecida em IgE a partir do soro-K - ensaio preliminar _____	54
4.3.2. Cromatografia de permeação em gel para obtenção da solução final enriquecida em IgE - ensaio preliminar _____	57
4.3.3. Cromatografia de afinidade para obtenção de solução enriquecida em IgE a partir do soro-G _____	58
4.3.4. Cromatografia de permeação em gel para obtenção da solução final enriquecida em IgE _____	61
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E SUGESTÕES _____	65
CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	67
APÊNDICE A _____	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Seqüência de eventos na hipersensibilidade imediata.	6
Figura 2.2: Estrutura básica de uma molécula de imunoglobulina E.	8
Figura 2.3: Princípio do tratamento extracorpóreo por adsorção seletiva de IgE.	11
Figura 3.1: Fluxograma da metodologia geral.	19
Figura 3.2: Esquema da montagem experimental: sistema de cromatografia de baixa pressão.	27
Figura 3.3: Esquema da montagem experimental para circulação de plasma pela coluna agarose- <i>Lens culinaris</i> .	28
Figura 3.4: Esquema da montagem experimental: sistema de cromatografia de baixa pressão com as colunas em série agarose-jacalina e Sepharose 4B-con A.	32
Figura 4.1: Porcentagens de remoção (%R) de IgE total, IgE <sub>D1</sub> ( <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> ) e IgE <sub>D201</sub> ( <i>Blomia tropicalis</i> ) obtidas nos experimentos realizados em frascos agitados empregando o “pool” e o controle negativo A.	41
Figura 4.2: Porcentagens de remoção (%R) de IgA, IgG, IgM e albumina obtidas nos experimentos realizados em frascos agitados empregando-se o “pool”.	44
Figura 4.3: Perfil cromatográfico de plasma humano em agarose- <i>Lens culinaris</i> . Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida gradiente 4 a 15%, sob condições desnaturantes e não-redutoras.	48
Figura 4.4: Cristais formados após evaporação das frações de eluição da coluna Sepharose-con A, cromatografia a partir do soro-K.	56

Figura 4.5: Cromatografia de permeação em gel de alto desempenho na coluna Protein Pak 300 sw; fase móvel tampão PBS 0,1 M pH 7,4, vazão 0,5 mL/min, injeções de 200  $\mu$ L, 25 °C. \_\_\_\_\_ 57

Figura 4.6: Cristais formados após evaporação das frações de eluição da coluna Sepharose-con A, cromatografia a partir do soro-G. \_\_\_\_\_ 60

Figura 4.7: Cromatografia de permeação em gel de alto desempenho na coluna Protein Pak 300 sw; fase móvel tampão PBS 0,1 M pH 7,4, vazão 0,25 mL/min, injeções de 200  $\mu$ L, 25 °C. \_\_\_\_\_ 61

Figura 4.8: Eletroforese SDS-PAGE e “immunoblotting” das frações de cromatografia de permeação em gel de alto desempenho na coluna Protein Pak 300 sw. \_\_\_\_\_ 64

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1: Especificações dos adsorventes utilizados. _____	20
Tabela 3.2: Níveis de IgE total, IgE's específicas a <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (IgE <sub>D1</sub> ) e <i>Blomia tropicalis</i> (IgE <sub>D201</sub> ), IgA, IgG, IgM, albumina, C3 e C4 presentes nas amostras séricas e plasmáticas. _____	23
Tabela 3.3: Variáveis operacionais testadas em seis ensaios cromatográficos com gel agarose- <i>Lens culinaris</i> . _____	29
Tabela 4.1: Porcentagens de remoção (%R) de IgA, IgG, IgM e albumina dos suportes estudados obtidas nos experimentos realizados em frascos agitados empregando-se os controles negativos A (CNA) e B (CNB). _____	45
Tabela 4.2: Porcentagens de consumo (%c) de C3 e C4 para os suportes de afinidade estudados, obtidas de experimentos em batelada, empregando-se soro fresco. _____	46
Tabela 4.3: Balanço de massa para IgA, IgG, IgM, albumina e IgE total resultante das análises de nefelometria e FEIA do plasma-K e das frações de lavagem e eluição da cromatografia em gel agarose- <i>Lens culinaris</i> . _____	49
Tabela 4.4: Porcentagens de adsorção (%A) de IgE total, IgE <sub>D1</sub> , IgA, IgG, IgM e albumina à agarose- <i>Lens culinaris</i> em função de seis condições experimentais. _____	51
Tabela 4.5: Balanço de massa para IgA, IgG, IgM, albumina e IgE total resultante da cromatografia com as colunas agarose-jacalina e Sepharose-con A em série, a partir do soro-K. _____	55
Tabela 4.6: Quantidade de imunoglobulinas, albumina e IgE <sub>Relat</sub> <sup>1</sup> presentes nas amostras de injeção e solução enriquecida em IgE (após diálise e evaporação), obtidas da cromatografia com as colunas agarose-jacalina e Sepharose-con A em série, a partir do soro-K. _____	56



Tabela 4.7: Quantidade de imunoglobulinas, albumina e  $IgE_{Relat}$  presentes nas amostras de injeção, picos e frações obtidos na cromatografia de permeação em gel (ensaio preliminar). \_\_\_\_\_ 58

Tabela 4.8: Balanço de massa para IgA, IgG, IgM, albumina e IgE total resultante da cromatografia com as colunas agarose-jacalina e Sepharose-con A em série, a partir do soro-G. \_\_\_\_\_ 59

Tabela 4.9: Quantidade de imunoglobulinas, albumina e  $IgE_{Relat}^1$  presentes nas amostras de injeção e solução enriquecida em IgE (após diálise e evaporação), obtidas da cromatografia com as colunas agarose-jacalina e Sepharose-con A em série, a partir do soro-G. \_\_\_\_\_ 60

Tabela 4.10: Quantidade de imunoglobulinas, albumina e  $IgE_{Relat}$  presentes nas amostras de injeção, picos e frações obtidos na cromatografia de permeação em gel, vazão 0,25 mL/min. \_\_\_\_\_ 62

Tabela 4.11: Comparação dos valores de porcentagens de recuperação ( $\%Recup_{IgE}$ ) e fator de enriquecimento em IgE em relação aos isotipos IgA, IgG, IgM e à albumina (FE), obtidos nas etapas de afinidade e permeação em gel (HPGPC) dos ensaios a partir do soro-K e do soro-G. \_\_\_\_\_ 63

Tabela 1A: Porcentagens de remoção (%R) de IgE total,  $IgE_{D1}$  (*Dermatophagoides pteronyssinus*) e  $IgE_{D201}$  (*Blomia tropicalis*) obtidas nos experimentos realizados em frascos agitados empregando-se o “pool”. \_\_\_\_\_ 75

Tabela 2A: Porcentagens de remoção (%R) de IgE total obtidas nos experimentos realizados em frascos agitados empregando-se o controle negativo A. \_\_\_\_\_ 76

Tabela 3A: Porcentagens de remoção (%R) de IgA, IgG, IgM e albumina dos suportes estudados obtidas nos experimentos realizados em frascos agitados empregando-se o “pool”. \_\_\_\_\_ 76

## NOMENCLATURA

### LETRAS LATINAS

$%A$	porcentagem de adsorção
$%C$	porcentagem de consumo
$E_{Alb}$	massa de albumina presente na solução enriquecida em IgE, mg
$E_{Ig}$	soma das massas de isotipos IgA, IgG e IgM presentes na solução enriquecida em IgE, mg
$E_{IgE}$	massa de IgE presente na solução enriquecida em IgE, mg
$E_{Relat}$	porcentagem em massa de IgE total em relação aos isotipos IgA, IgG, IgM e à albumina, presente na solução enriquecida de IgE
$FE$	fator de enriquecimento em IgE em relação aos isotipos IgA, IgG, IgM e à albumina, adimensional
$I_{Alb}$	massa de albumina presente na amostra de injeção, mg
$I_{Ig}$	soma das massas de isotipos IgA, IgG e IgM presentes na amostra de injeção, mg
$I_{IgE}$	massa de IgE presente na amostra de injeção, mg
$I_{Relat}$	porcentagem em massa de IgE total em relação aos isotipos IgA, IgG, IgM e à albumina, presente na amostra de injeção
$IgE_{Relat}$	porcentagem em massa de IgE total em relação aos isotipos IgA, IgG, IgM e à albumina
$ND$	valores não detectáveis, ou seja, abaixo do limite de detecção do método
$npp$	número de passagens de plasma pela coluna, adimensional
$Q_{ads}$	massa de C3 ou C4 presente no sobrenadante após incubação com cada adsorvente, mg
$Q_{elu}$	massa de IgE total, $IgE_{DI}$ , IgA, IgG, IgM ou albumina eluída, kU ou mg

$Q_m$	capacidade máxima de adsorção do gel, mg/mL gel
$Q_{pi}$	massa de IgE total, IgE <sub>D1</sub> , IgA, IgG, IgM ou albumina presente na amostra plasmática inicial, kU ou mg
$Q_{sc}$	massa de C3 ou C4 presente no soro controle (após incubação), mg
$Q_{sf}$	massa de IgE total, IgE <sub>D1</sub> , IgE <sub>D201</sub> , IgA, IgG, IgM ou albumina presente na amostra sérica final, kU ou mg
$Q_{si}$	massa de IgE total, IgE <sub>D1</sub> , IgE <sub>D201</sub> , IgA, IgG, IgM ou albumina presente na amostra sérica inicial, kU ou mg
%R	porcentagem de remoção
%Recup <sub>IgE</sub>	porcentagem de recuperação de IgE
T	temperatura, °C
vp/vl	razão entre volume de plasma e volume de leite, adimensional

#### LETRAS GREGAS

v	velocidade superficial, cm/min
---	--------------------------------

#### SIGLAS E ABREVIATURAS

Ah	aminohexil
CNA	controle negativo A
CNB	controle negativo B
CNC	controle negativo C
Con A	concanavalina A
D-trp	D-triptofano
FEIA	Fluoroenzimaimunoensaio
HPGPC	cromatografia de permeação em gel de alto desempenho
IgA	imunoglobulina do isotipo A
IgE	imunoglobulina do isotipo E

IgE <sub>D1</sub>	IgE específica a <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
IgE <sub>D201</sub>	IgE específica a <i>Blomia tropicalis</i>
IgG	imunoglobulina do isotipo G
IgM	imunoglobulina do isotipo M
Lc	<i>Lens culinaris</i>
LIAE	Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental
PBS	“Phosphate buffer saline”, tampão fosfato de sódio contendo NaCl
PLL	poli-L-lisina
SDS-PAGE	“Sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis”
Seph	Sepharose
Tris	hidroximetil aminometano

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO E OBJETIVO

### 1.1. INTRODUÇÃO

O termo alergia foi usado primeiramente por Clements Von Pirquet em 1906, para designar um “estado de reatividade alterada”, após a observação de que substâncias imunes específicas (anticorpos) poderiam não somente prevenir doenças, mas também levar a uma resposta desfavorável do organismo (reações alérgicas). Em 1968, na tentativa de diferenciar e organizar didaticamente estas reações, Gell & Coombs, classificaram quatro tipos de reações de hipersensibilidade: Tipo I (anafiláticas), tipo II (citotóxicas), tipo III (por imunocomplexos) e tipo IV (retardada ou tardia) (ROSÁRIO FILHO, 1991).

As reações de hipersensibilidade correspondem a reações de imunidade específica dirigida contra antígenos localizados na superfície de células ou em tecidos, originando lesões celulares ou reações inflamatórias. As hipersensibilidades do tipo I são reações inflamatórias mediadas por anticorpos do tipo imunoglobulina E (IgE), que são dirigidas contra substâncias alergênicas<sup>1</sup>, tais como ácaros, veneno de insetos, pólenes, dentre outras. Estas reações resultam da liberação de substâncias farmacologicamente ativas, denominadas mediadores de hipersensibilidade imediata, acarretando uma seqüência de efeitos locais e sistêmicos, podendo evoluir para o êxito letal se não tratado imediatamente. As ações farmacológicas destas substâncias explicam quadros clínicos descritos como alérgicos, reagínicos ou anafiláticos. Os exemplos mais freqüentes são a asma brônquica, a rinite alérgica, a urticária e o choque anafilático (ABBAS, LICHTMAN, POBER, 2000). A concentração de IgE total no sangue de indivíduos geneticamente predispostos a manifestar reações por hipersensibilidade imediata pode ser até 10.000 vezes mais alta do que em indivíduos normais (CASOLARO *et al.*, 1996).

Normalmente, a hipersensibilidade do tipo I sistêmica ou localizada é tratada com a administração de medicamentos como anti-histamínicos, descongestionantes,

---

<sup>1</sup> antígenos que induzem reações de hipersensibilidade

vasoconstritores e corticosteróides, expondo o indivíduo a seus efeitos colaterais (BARNES, 2000). Além desta terapia medicamentosa, pode-se utilizar a imunoterapia ou dessensibilização, que consiste na administração por via subcutânea de quantidades pequenas, mas crescentes do antígeno. Em decorrência deste tratamento, os níveis de IgE específica diminuem. A imunoterapia tem sido bem sucedida na prevenção de respostas alérgicas aos antígenos protéicos como, por exemplo, veneno de inseto (GOLDEN, 2005) ou pólen (SINGH & BHALLA, 2003). Entretanto, sua eficácia é variável para as afecções atópicas crônicas, tais como a rinite alérgica e asma (BARNES, 2000; SCHULTZ *et al.*, 2003).

O conhecimento aprofundado das interações entre a IgE e ligantes de afinidade (proteínas, aminoácidos, dentre outros) pode levar ao desenvolvimento de novos tratamentos da hipersensibilidade do tipo I, por exemplo, a terapia de adsorção seletiva através de circulação extracorpórea, assim como ao desenvolvimento de métodos de obtenção de IgE purificada, para aplicação nas áreas de diagnósticos, pesquisa molecular, dentre outras.

A terapia de adsorção seletiva através de circulação extracorpórea tem sido investigada como adjuvante à administração de anti-histamínicos, descongestionantes, vasoconstritores e corticosteróides (SATO *et al.*, 1989; GORCHAKOV *et al.*, 1991; ADACHI *et al.*, 1995), sendo indicada em situações de emergências alérgicas, tais como reações anafiláticas devido a acidentes com insetos, administração de medicamentos ou ingestão de alimentos. Nesta terapia, as moléculas de IgE são removidas do organismo através de circulação extracorpórea do sangue do paciente por uma coluna contendo um ligante imobilizado em uma matriz sólida (imunoadsorvente) que interage com a proteína patogênica, a IgE. A vantagem dos métodos de adsorção seletiva consiste na remoção exclusiva da substância causadora dos sintomas da doença, através da interação específica entre o ligante imobilizado e a proteína a ser removida.

Há relatos de trabalhos envolvendo purificação de IgE (IKEYAMA *et al.*, 1986; KLEINE-TEBBE *et al.*, 1995), tratamentos extracorpóreos *ex vivo*<sup>2</sup> em humanos (LEBEDIN *et*

---

<sup>2</sup> *ex vivo*: locução latina que designa procedimento em que um órgão é retirado do corpo a que pertence, é tratado cirurgicamente e retorna, imediatamente, à sua posição anatômica, no organismo de que proveio (FERREIRA, 1993)

*al.*, 1991; GORCHAKOV *et al.*, 1991) e *in vivo* em ratos (ADACHI *et al.*, 1995), nos quais os tipos de ligantes testados para adsorção de IgE foram anticorpos anti-IgE humana imobilizados em Affi-Gel 10 (gel agarose reticulado contendo grupos éster N-hidroxisucinimida) e em Sepharose CL-4B e anticorpos anti-IgE de rato imobilizados em membrana de celulose. Apesar dos bons resultados obtidos por esses pesquisadores, imunoadsorventes com anticorpo anti-IgE imobilizado são de alto custo e de difícil obtenção, devido às várias etapas envolvidas na sua produção. Para a obtenção deste tipo de adsorvente, são necessárias pelo menos quatro etapas (IKEYAMA *et al.*, 1986; SATO *et al.*, 1989): 1) purificação de IgE humana a partir de soro de indivíduos atópicos ou do sobrenadante da cultura de linhagens de células de mielomas, através de cromatografia de afinidade; 2) injeção em animais (ratos, cabras ou coelhos) de IgE purificada, até que a concentração de anti-IgE no soro destes atinja altos níveis, ou seja, ocorra hiperimunização do animal; 3) coleta do sangue do animal e purificação dos anticorpos anti-IgE contidos no soro através de três etapas: a) precipitação com sulfato de amônio, b) cromatografia de troca iônica em DEAE celulose e c) cromatografia de afinidade utilizando IgE imobilizada em celulose; 4) imobilização dos anticorpos anti-IgE de maneira orientada no suporte. Convém ressaltar que a obtenção deste adsorvente depende diretamente da purificação da IgE.

Diante dessa difícil obtenção e do alto custo, o uso de anticorpos anti-IgE como ligantes de afinidade para emprego tanto na terapia de adsorção seletiva quanto na purificação de IgE, tem sido limitado, levando pesquisadores a investigarem a interação molecular de IgE com outros ligantes que sejam mais simples e de menor custo.

Com outra finalidade que não seja o tratamento extracorpóreo, ligantes bioespecíficos de menor custo (com especificidade de grupo, por exemplo lectinas) e ligantes pseudobioespecíficos (poliaminas e triptofano) têm sido utilizados em estudos de purificação, de interação molecular e de estrutura-função envolvendo moléculas de IgE.

Com objetivo de investigar as características estruturais e funcionais dos oligossacarídeos presentes na molécula de IgE, SHIBASAKI e colaboradores (1992) estudaram a interação de 12 tipos de lectinas com IgE humana proveniente de soro de indivíduos atópicos. Esses pesquisadores observaram reações de alta afinidade entre a IgE e concanavalina A (con A), *Lens culinaris* hemaglutinina (LcH), *Pisum sativum* aglutinina (PSA), *Ricinus communis* aglutinina I (RCA-I) e fitohemaglutinina E (PHA-E). Objetivando

estudar a afinidade entre Sepharose 4B-con A e as imunoglobulinas de soro humano sadio e de soro de pacientes com mieloma, RAY & RAYCHAUDHURI (1982) constataram maior adsorção de IgE e de imunoglobulina do isotipo M (IgM) e menor adsorção de imunoglobulinas dos isotipos A (IgA) e G (IgG) naquela matriz de afinidade. Em testes diagnósticos de rotina para detecção de IgE, ZHAO e colaboradores (2000) verificaram que em alguns soros de pacientes alérgicos a drogas, as imunoglobulinas E apresentavam interação específica por poli-L-lisina (PLL). Em seguida, este grupo de pesquisadores realizou estudos de estrutura-função, avaliando o reconhecimento estrutural de diversas poliaminas por anticorpos humanos do isotipo IgE.

IKONOMOV e colaboradores (1992) compararam a adsorção de imunoglobulinas e outros constituintes do plasma em quatro tipos de ligantes de afinidade: proteína A, triptofano, fenilalanina e sulfato de dextrana e constataram que grandes quantidades de IgE eram adsorvidas em triptofano imobilizado em partículas de álcool poli(vinílico), PVA.

Com base nestes resultados, verifica-se o potencial de utilização de lectinas, poliaminas e aminoácidos visando a remoção seletiva de IgE do plasma de indivíduos atópicos, assim como a purificação desta imunoglobulina, de forma eficiente e com menor custo.

## 1.2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi selecionar e avaliar o desempenho de adsorventes alternativos ao Sepharose-anti-IgE empregado na terapia de adsorção seletiva de IgE (através de circulação extracorpórea) e em etapas intermediárias do processo de purificação desta imunoglobulina. Os adsorventes estudados eram constituídos por ligantes bioespecíficos de especificidade de grupo (Sepharose-con A e agarose-*Lens culinaris*) e pseudobioespecíficos (agarose-poli-L-lisina, agarose-D-triptofano e agarose-aminoetil), os quais são mais baratos e mais simples de serem obtidos do que o Sepharose-anti-IgE. O desempenho dos adsorventes previamente selecionados foi avaliado em relação às duas aplicações, ou seja, em experimentos de simulação de circulação extracorpórea e em ensaios visando obtenção de solução enriquecida em IgE, como etapa intermediária do processo de purificação de IgE a partir de soluções séricas.



## CAPÍTULO 2

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são abordados conhecimentos básicos e relevantes para a compreensão desse trabalho. A revisão da literatura é dividida em seis tópicos: reações de hipersensibilidade imediata, imunoglobulina E, tratamento padrão da hipersensibilidade I, terapia de adsorção seletiva de IgE através de circulação extracorpórea do sangue, processos de purificação de IgE e ligantes de afinidade.

#### 2.1. REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE IMEDIATA

Um dos mecanismos efetores do sistema imune é a reação iniciada nos tecidos pela ação da imunoglobulina E (IgE) sobre os mastócitos e basófilos. Os mastócitos e basófilos são células que estão presentes no tecido conjuntivo, especialmente no subcutâneo. Elas contêm em sua superfície receptores de alta afinidade para a porção Fc de moléculas de IgE (receptores FcεRI), e em seu interior, grande quantidade de grânulos citoplasmáticos com diversos mediadores químicos (ROSÁRIO FILHO, 1991). A exposição inicial ao antígeno estimula as células T CD4<sup>+</sup> a se diferenciarem em células T efectoras T<sub>H</sub>2, as quais produzem interleucina-4 (IL-4), promovendo a diferenciação das células B (específicas para aquele antígeno) em células produtoras de IgE. Essa imunoglobulina secretada liga-se aos receptores FcεRI nas superfícies dos basófilos e mastócitos. Se o antígeno for reintroduzido, liga-se às IgEs pré-fixadas à superfície dos mastócitos e basófilos, promovendo a formação de complexos que ativam os receptores FcεRI aos quais estão ligadas. Essa reação por sua vez, ativa os mastócitos, induzindo a liberação de mediadores pré-formados (tais como, histamina e heparina) e rápida síntese e liberação de outros mediadores (por exemplo, prostaglandina D<sub>2</sub>, leucotrienos e fator ativador de plaquetas), que determinam o aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, contração da musculatura lisa brônquica e visceral e inflamação local. Esta reação é chamada de hipersensibilidade imediata porque começa rapidamente, minutos após a provocação pelo antígeno (Figura 2.1). As manifestações clínicas e patológicas da

hipersensibilidade imediata são devidas às ações dos mediadores liberados. Em sua forma sistêmica mais extrema, chamada anafilaxia, os mediadores derivados dos mastócitos ou dos basófilos podem provocar constrição das vias respiratórias até a ponto de asfixia e produzir colapso cardiovascular, induzindo à morte (ABBAS *et al.*, 2000).

Os indivíduos geneticamente predispostos a manifestar reações por hipersensibilidade imediata e polissensibilizados aos alérgenos ambientais são considerados atópicos. Geralmente, estes indivíduos possuem teores de IgE total próximos do limite superior da faixa de normalidade até 10.000 vezes mais elevados do que as pessoas não-atópicas. Estes indivíduos podem apresentar rinite, asma ou dermatite atópica, isoladamente ou em conjunto, consideradas doenças clássicas da hipersensibilidade do tipo I. A prevalência dessas doenças alérgicas tem aumentado nas últimas décadas e, atualmente, afetam entre 20 e 30% da população mundial, influenciando na produtividade e na qualidade de vida dos indivíduos (CASOLARO *et al.*, 1996).

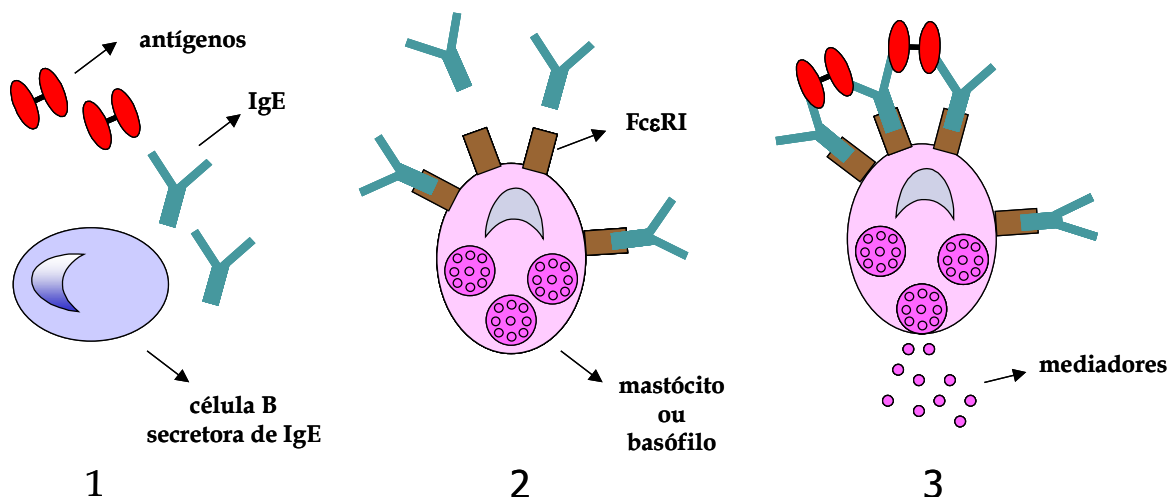


Figura 2.1: Seqüência de eventos na hipersensibilidade imediata. (1) produção de IgE pelas células B em resposta à exposição inicial ao antígeno, (2) ligação da IgE aos receptores FcεRI presentes nas superfícies dos mastócitos e dos basófilos, e (3) reintrodução do antígeno que se liga às IgEs pré-fixadas à superfície dos mastócitos e basófilos, promovendo a formação de complexos que ativam os receptores FcεRI aos quais estão ligadas. Essa reação por sua vez, ativa os mastócitos, induzindo a liberação de mediadores (ABBAS *et al.*, 2000).

Para maior compreensão das reações de hipersensibilidade, torna-se necessário um estudo mais detalhado sobre um dos agentes responsáveis pelo seu desencadeamento, as imunoglobulinas E.

## 2.2. IMUNOGLOBULINA E

A presença de anticorpos reagínicos ou sensibilizantes na pele e no soro de pacientes alérgicos foi primeiramente demonstrada por Prausnitz e Kustner em 1921. O soro de Kustner, que era alérgico a peixe, foi injetado em Prausnitz e em seguida, um antígeno do peixe foi aplicado na pele de Prausnitz, havendo uma reação imediata, com formação de pápula e eritema local. Posteriormente, ISHIZAKA & ISHIZAKA em 1967, descobriram que os anticorpos envolvidos nesta reação pertenciam a um único isotipo de imunoglobulina, chamada imunoglobulina E (IgE). Alguns anos depois, descobriu-se que esta imunoglobulina juntamente com os receptores FcεRI em eosinófilos, atuavam na resposta imune contra parasitas (GOUNNI *et al.*, 1994).

A IgE representa somente 0,001% do total das imunoglobulinas séricas, circulando no plasma em concentrações médias na faixa de 50 a 300 ng/mL (1,0 ng/mL de IgE total, corresponde a aproximadamente 0,36 UI/mL) (SUTTON & GOULD, 1993). Sob condições patológicas, como no caso de algumas doenças parasitárias (por exemplo, helmintos) e da atopia grave, este nível pode se elevar até mais de 1000 µg/mL (ABBAS *et al.*, 2000). A IgE apresenta a mesma estrutura básica das outras imunoglobulinas. Cada molécula é composta de duas cadeias polipeptídicas leves idênticas (L) e duas cadeias pesadas idênticas (H), ligadas por pontes dissulfeto (Figura 2.2). As cadeias leves podem ser do tipo kappa (κ) ou lambda (λ). O terminal amino (porção N terminal) é caracterizado por composição de aminoácidos altamente variável nas cadeias leve e pesada, que são referidas como V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub>. A parte constante da cadeia leve é chamada C<sub>L</sub> e a região constante da cadeia pesada é dividida em quatro partes C<sub>ε1</sub>, C<sub>ε2</sub>, C<sub>ε3</sub>, C<sub>ε4</sub>. A molécula pode ser clivada por proteases, tais como pepsina (obtendo-se os fragmentos F(ab')<sub>2</sub>) e papaína (originando-se dois fragmentos Fab e o Fc) (SUTTON & GOULD, 1993; ROITT, BROSTOFF, MALE, 1999).

A molécula de IgE possui massa molecular elevada (190 kDa), devido ao grande número de aminoácidos da cadeia pesada ε, distribuídos em cinco domínios. A IgE liga-se

às células através de dois receptores, o receptor de alta afinidade  $Fc\epsilon RI$ , encontrado em mastócitos, basófilos, células de Langerhans e eosinófilos, e o receptor de baixa afinidade  $Fc\epsilon RII$  (ou CD23), encontrado em linfócitos B e T, monócitos e eosinófilos (SUTTON & GOULD, 1993; ROITT *et al.*, 1999).

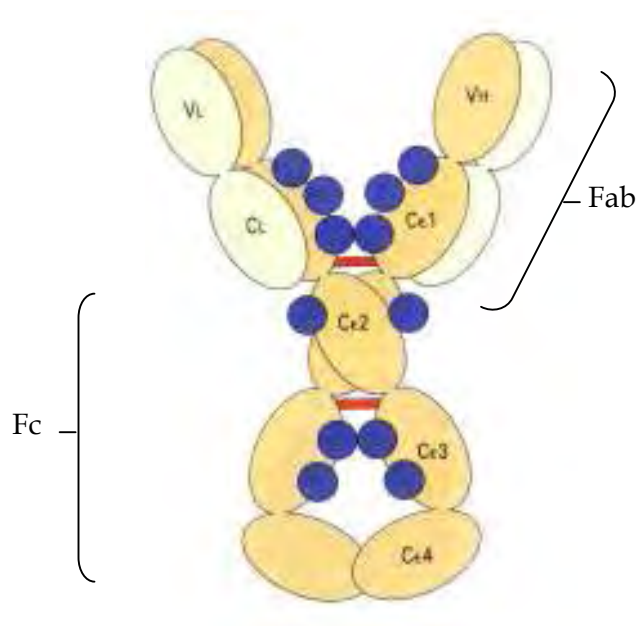


Figura 2.2: Estrutura básica de uma molécula de imunoglobulina E. C: região constante; V: região variável; L: cadeia leve; H: cadeia pesada. As esferas azuis representam unidades de carboidratos e os bastões vermelhos, pontes dissulfeto (S-S). As pontes dissulfeto intracadeias não são mostradas nesta figura (adaptado de SUTTON & GOULD, 1993; ROITT *et al.*, 1999).

A estrutura molecular da IgE também apresenta 6 resíduos de carboidratos situados nas regiões  $C\epsilon_1$ ,  $C\epsilon_2$  e  $C\epsilon_3$  da cadeia pesada, totalizando 11,0 a 12,7% (em massa) da molécula inteira. Este alto nível de componentes de carboidratos, pode ser responsável por algumas atividades biológicas tais como a ligação a várias glicoproteínas e lectinas (ZAVÁZAL & KRAUZ, 1985).

### 2.3. TRATAMENTO PADRÃO DA HIPERSENSIBILIDADE I

A terapia padrão usada nos casos de distúrbios atópicos consiste em bloquear a produção ou a liberação de mediadores (por exemplo, com a administração de corticosteróides ou cromonas) ou antagonizar as ações dos mediadores sobre as células-

alvo (por exemplo, com antagonistas dos receptores da histamina, de leucotrienos ou com agonistas  $\beta$ -adrenérgicos). Porém, os efeitos colaterais decorrentes da administração prolongada dessas drogas são fatores limitantes ao seu uso (BARNES, 2000). Os imunologistas clínicos tentam muitas vezes limitar o início de reações alérgicas por tratamentos destinados a reduzir a quantidade de IgE presente no indivíduo. Em uma abordagem designada dessensibilização, antígenos em quantidades pequenas, porém crescentes, são administrados por via subcutânea durante um período de horas ou mais gradualmente durante semanas ou meses. Como resultado deste tratamento, os níveis de IgE específica diminuem e os de IgG muitas vezes aumentam. Esta abordagem, cujo mecanismo preciso ainda não foi elucidado, tem tido, entretanto, muito sucesso em evitar respostas anafiláticas agudas a antígenos protéicos como, por exemplo, venenos de insetos (GOLDEN, 2005) ou pólenes (SINGH & BHALLA, 2003). Entretanto, sua eficácia é mais variável para as afecções atópicas crônicas, tais como a rinite alérgica e asma (BARNES, 2000; SCHULTZ *et al.*, 2003).

Outra abordagem terapêutica relacionada à diminuição dos níveis de IgE no soro de pacientes atópicos, consiste na administração de anticorpos monoclonais humanizados anti-IgE, por exemplo, o Omalizumab. Esse anticorpo foi recentemente aprovado para comercialização na Austrália, para tratar adultos e adolescentes com asma moderada. Nessa terapêutica, os anticorpos monoclonais interferem na interação da IgE com os receptores Fc $\epsilon$ RI, inibindo sua ligação aos mesmos, evitando assim, a ativação dos mastócitos e basófilos mediada pela IgE. Uma das vantagens dessa terapêutica é a possibilidade de tratamento de pacientes polissensibilizados, pois esse tratamento é independente da especificidade do alérgeno. Por outro lado, os custos elevados da terapia com anti-IgE tem limitado seu emprego (JARDIEU & FICK, 1999; SCHULTZ *et al.*, 2003).

O conhecimento aprofundado das interações entre a IgE e ligantes de afinidade (proteínas, aminoácidos, dentre outros) pode levar ao desenvolvimento de novos tratamentos da hipersensibilidade do tipo I, por exemplo a terapia de adsorção seletiva através de circulação extracorpórea, assim como ao desenvolvimento de métodos de obtenção de IgE purificada, para aplicação nas áreas de diagnósticos, pesquisa molecular, dentre outras.

## 2.4. TERAPIA DE ADSORÇÃO SELETIVA DE IgE ATRAVÉS DE CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA DO SANGUE

Em situações de emergências alérgicas, tais como reações anafiláticas em pacientes alérgicos devido a acidentes com insetos, administração de medicamentos ou ingestão de alimentos, tem-se investigado métodos alternativos para a remoção de IgE do organismo, a partir de um tratamento extracorpóreo do sangue do paciente: a troca de plasma (plasmaferese) ou a remoção seletiva de IgE.

Durante a plasmaferese, o sangue é retirado do paciente e, em seguida, filtrado ou centrifugado para que ocorra a separação entre as células sanguíneas e o plasma. As células retornam imediatamente ao paciente e seu plasma é substituído pelo plasma de um indivíduo sadio. Através dessa técnica, os ativadores e mediadores de hipersensibilidade imediata, anticorpos e complexos imunes, são removidos da circulação sanguínea (MALCHESKY *et al.*, 1993), sendo considerado um método não-seletivo e não-específico (RICHTER *et al.*, 1997). A plasmaferese convencional foi praticada em uso clínico, principalmente no tratamento de asma grave (GARTMANN, GROB, FREY, 1978; LASSALLE *et al.*, 1990) e urticária crônica (GREAVES, 2000), porém como o plasma é totalmente substituído pelo plasma do doador, proteínas estranhas, bactérias e vírus são transferidos ao paciente, podendo causar alergias, infecções virais como hepatite, AIDS, entre outras complicações (MALCHESKY *et al.*, 1993).

Na remoção seletiva de IgE do plasma, apenas a proteína de interesse (IgE) é eliminada e, assim, o restante das proteínas do sangue é retornado ao paciente sem qualquer modificação, evitando a perda dos componentes essenciais do plasma e eliminando a necessidade de sua reposição.

### 2.4.1. Princípio do tratamento extracorpóreo por adsorção seletiva de IgE

Na terapia de adsorção seletiva de IgE através de circulação extracorpórea, o sangue é retirado do paciente e, em seguida, filtrado ou centrifugado para que ocorra a separação entre as células sanguíneas e o plasma. As células retornam imediatamente ao paciente, enquanto o plasma é tratado através de adsorção seletiva em colunas contendo ligantes de afinidade imobilizados em uma matriz sólida. A proteína de interesse (IgE) é

adsorvida no ligante, enquanto que as moléculas não adsorvidas retornam ao paciente, conforme esquematizado na Figura 2.3.

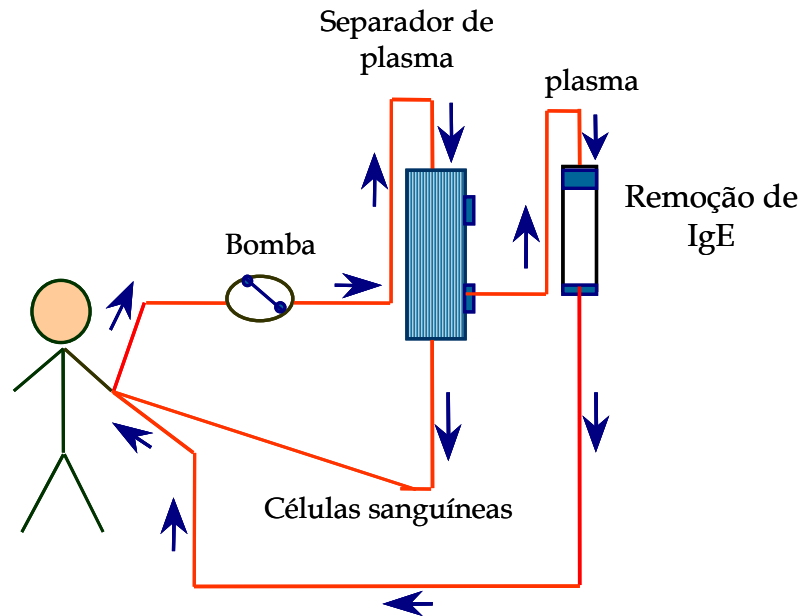


Figura 2.3: Princípio do tratamento extracorpóreo por adsorção seletiva de IgE (adaptado de VENTURA, 1999).

Na bibliografia consultada há o relato de apenas ligantes bioespecíficos testados *ex vivo* e *in vivo* visando a remoção de IgE (terapia de adsorção seletiva): anticorpos anti-IgE humana imobilizados em Sepharose CL-4B (GORCHAKOV *et al.*, 1991; LEBEDIN *et al.*, 1991) e anticorpos anti-IgE de rato imobilizados em membrana de celulose (ADACHI *et al.*, 1995), respectivamente. GORCHAKOV e colaboradores (1991) utilizaram anticorpos anti-IgE humana imobilizados em Sepharose CL-4B para remoção *ex vivo* de IgE do plasma humano. A quantidade desta imunoglobulina removida foi de 781  $\mu\text{g}$  após tratamento de 2,2 litros de plasma do paciente atópico, o que foi considerado altamente eficiente. LEBEDIN e colaboradores (1991) usaram anticorpos monoclonais anti-IgE imobilizados em Sepharose CL 4B em 17 tratamentos (aférese clínica) para remoção de IgE do plasma de cinco pacientes atópicos asmáticos. Os resultados mostraram remoção efetiva de IgE (83 a 98%). O sistema desenvolvido por ADACHI e colaboradores (1995) não exigia separador de plasma e a remoção de IgE presente no sangue do rato foi de 70%, em 30 minutos de circulação extracorpórea.

Os requisitos para o desenvolvimento de adsorventes de afinidade visando a aplicação em tratamento extracorpóreo devem levar em consideração o equilíbrio biológico do plasma, um fluido altamente complexo. O adsorvente selecionado, além de possuir elevada capacidade e seletividade pela proteína de interesse, deve ser biocompatível (o contato da superfície do adsorvente com o plasma, não pode ativar a cascata de coagulação ou o sistema complemento, nem contribuir para a geração de atividade proteolítica de enzimas dos sistemas inflamatório e hemostático). Isso é essencial para evitar os possíveis efeitos colaterais provocados pelo plasma tratado retornado ao paciente. Além disso, o sistema de adsorção deve apresentar uma alta estabilidade para evitar a perda indesejável do ligante, um fenômeno crítico quando o tratamento é feito em pacientes com um sistema hemostático desequilibrado. O sistema de afinidade também deve ser resistente aos procedimentos de higiene, para que a reutilização do mesmo não seja comprometida. Portanto, embora o princípio de bioafinidade seja muito atrativo, o desenvolvimento de sistemas de afinidade deve levar em consideração a especificidade do ligante, a toxicidade, o possível desprendimento da matriz e o custo, buscando maximizar a pureza, o rendimento e a economia (BURNOUF, GOUBRAN, RADOSEVICH, 1998).

## 2.5. PURIFICAÇÃO DE IgE

A obtenção da molécula de IgE na sua forma pura tem tido um papel de fundamental importância em estudos de interação, estrutura-função e no desenvolvimento de reagentes para diagnósticos de alergias. A baixa concentração de IgE no soro humano (concentrações médias na faixa de 50 a 300 ng/mL, SUTTON & GOULD, 1993) somada à presença de quantidade considerável de outros tipos de imunoglobulinas com estrutura, massa molecular e pontos isoelétricos similares no meio, limita o emprego de várias técnicas de purificação.

ISHIZAKA & ISHIZAKA (1967), desenvolveram e publicaram um dos primeiros métodos de purificação de IgE humana a partir de soro de pacientes atópicos, utilizando as seguintes etapas: precipitação com sulfato de amônio a 50% de saturação, cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-celulose, permeação em gel em coluna Sephadex G200, cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sephadex e, finalmente, cromatografia de afinidade empregando anticorpos anti-IgG e anti-IgA immobilizados em Sepharose. Apesar



da solução final não conter quantidades detectáveis de IgG e IgA, os resultados mostraram que ela continha outras proteínas séricas.

IKEYAMA e colaboradores (1986) isolaram pela primeira vez IgE humana do sobrenadante do cultivo de células de mieloma (linhagem U266), através de dois métodos. O primeiro consistia de várias etapas: precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de afinidade empregando a coluna Sepharose 4B-lisina, cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharcel, permeação em gel em coluna Sephacryl S-300 (com reciclo) e remoção de proteínas bovinas por meio da coluna Sepharose 4B-anti IgG bovina. O segundo método foi realizado através de cromatografia de afinidade empregando como ligante o anticorpo monoclonal anti-IgE humana. Este anticorpo foi produzido por um clone de hibridoma, resultante da fusão de células de mieloma P2U1 com células esplênicas de um camundongo BALB/c imunizado com a IgE humana previamente purificada pelo primeiro método.

Este ligante também foi empregado por KLEINE-TEBBE e colaboradores (1995) para purificação de IgE a partir de soro humano. Três etapas cromatográficas foram necessárias para se obter pureza superior a 99,9%: cromatografia de troca iônica (DEAE celulose), cromatografia de afinidade empregando anticorpos monoclonais anti-IgE imobilizados em Sepharose e cromatografia de afinidade usando anticorpos monoclonais anti-IgA, anti-IgG e anti-IgM imobilizados em Sepharose.

## 2.6. LIGANTES DE AFINIDADE UTILIZADOS PARA PURIFICAÇÃO DE IgE E PARA REMOÇÃO DE IgE POR TRATAMENTO EXTRACORPÓREO

Dois tipos de ligantes de afinidade são empregados em processos cromatográficos de adsorção por afinidade: os bioespecíficos e os pseudobioespecíficos (VIJAYALAKSHMI, 1989; BURNOUF *et al.*, 1998). Os bioespecíficos geralmente são macromoléculas biológicas como anticorpos monoclonais, anti-IgE, anti-IgG, DNA, proteína A, proteína G e proteína L, com alta especificidade pela molécula de interesse. No entanto estes ligantes são frágeis, difíceis de serem imobilizados nos suportes sólidos e podem vir a ser desprendidos da matriz, ocasionando sérios problemas ao paciente (por serem tóxicos) ou contaminando soluções purificadas. Dentre os ligantes bioespecíficos, existem também ligantes de especificidade de grupo, que apesar de possuírem algumas

das desvantagens citadas anteriormente, são de menor custo e no caso específico de lectinas, podem se ligar a vários tipos de glicoproteínas. Os ligantes pseudobioespecíficos, tais como poliaminas e os aminoácidos triptofano, fenilalanina e histidina, apesar de apresentarem especificidade menor do que os bioespecíficos, são mais estáveis, de baixo custo e de menor toxicidade no caso de desprendimento da matriz.

Como citado anteriormente, os ligantes empregados para purificação de IgE e para remoção de IgE por tratamento extracorpóreo tem sido usualmente anticorpos anti-IgE. Apesar dos bons resultados obtidos na purificação de IgE (pureza superior a 99%, KLEINE-TEBBE *et al.*, 1995) e na remoção de IgE (GORCHAKOV *et al.*, 1991; LEBEDIN *et al.*, 1991), os imunoabsorventes com anticorpos anti-IgE imobilizados são de alto custo e de difícil obtenção, devido às várias etapas envolvidas na sua produção (descritas na introdução deste trabalho). Assim, o emprego de anticorpos anti-IgE como ligantes de afinidade para emprego tanto na terapia de adsorção seletiva quanto na purificação de IgE, tem sido limitado, levando pesquisadores a investigarem outros ligantes de maior simplicidade e de menor custo.

Com outra finalidade que não seja o tratamento extracorpóreo, ligantes pseudobioespecíficos (poliaminas e triptofano) e ligantes bioespecíficos de menor custo (com especificidade de grupo, por exemplo lectinas), têm sido utilizados em estudos de purificação, de interação e de estrutura-função envolvendo moléculas de IgE.

As poliaminas (por exemplo, poli-L-lisina) estão presentes em todos os organismos vivos e são necessárias para o crescimento e replicação de todos os tipos celulares (MORGAN, 1998). Em testes diagnósticos de rotina para detecção de IgE, ZHAO e colaboradores (2000) verificaram que em alguns soros de pacientes alérgicos a drogas, as imunoglobulinas E apresentavam interação específica por poli-L-lisina (PLL). Em seguida, este grupo de pesquisadores realizou estudos de estrutura-função, avaliando o reconhecimento estrutural de diversas poliaminas por anticorpos do tipo IgE humana.

O aminoácido triptofano imobilizado em gel de álcool polivinílico (PVA), introduzido na década de 70 como imunoabsorvente, tem sido utilizado com sucesso no tratamento de vários distúrbios imunes. O gel é constituído por PVA altamente poroso no qual o triptofano é ligado covalentemente (YAMAZAKI, IDESUKI, INOUE, 1989). Como este aminoácido é encontrado fisiologicamente no organismo, ele não acarreta danos ao paciente no caso de desprendimento da matriz (YAMAZAKI, IDESUKI, ASANO, 1985).

Estudos *in vitro*, realizados por IKONOMOV e colaboradores (1992), compararam a adsorção de imunoglobulinas e outros constituintes do plasma em quatro tipos de suportes de afinidade: Sepharose-proteína A, triptofano-PVA, fenilalanina-PVA e sulfato de dextrana. O adsorvente triptofano-PVA mostrou notável adsorção de IgE, confirmando resultados obtidos por BEHM, KURODA, YAMAWAKI (1987). A quantidade de IgE retida neste suporte foi 55% do total presente no soro de pacientes, enquanto que a quantidade retida em Sepharose-proteína A foi de 33% (IKONOMOV *et al.*, 1992).

As lectinas, ligantes classificados como bioespecíficos com especificidade de grupo (CARLSSON, JANSON, SPARRMAN, 1989), podem se ligar a vários tipos de glicoproteínas, dependendo de suas especificidades. As lectinas são proteínas, algumas glicosiladas, de origem não imunológica que se ligam reversivelmente a monossacarídeos e oligossacarídeos com alta especificidade. Cada molécula de lectina contém dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, ou seja, são divalentes ou polivalentes. Portanto, quando elas reagem com células (por exemplo, eritrócitos), elas não apenas se ligam aos carboidratos presentes na superfície das mesmas, mas também causam reticulação das células e subsequente precipitação, um fenômeno conhecido como aglutinação celular. As lectinas também formam reticulação entre polissacarídeos ou glicoproteínas em solução e induzem sua precipitação. Tanto as reações de precipitação quanto as de aglutinação induzidas por lectinas são inibidas pelos carboidratos dos quais elas são específicas (LIS & SHARON, 1998).

As lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas na maioria dos organismos, desde vírus e bactérias até plantas e animais (LIS & SHARON, 1998). Entretanto, as lectinas estudadas mais detalhadamente são aquelas extraídas de plantas, talvez devido à sua extensa disponibilidade e facilidade de isolamento (LORIS *et al.*, 1998). Após a extração, essas lectinas podem ser isoladas tanto por meio de técnicas de purificação convencionais (precipitação por sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e permeação em gel) quanto por cromatografia de afinidade (KENNEDY *et al.*, 1995).

Devido à habilidade de se ligar especificamente a carboidratos que desempenham papéis importantes em reconhecimento biológico, as lectinas têm sido utilizadas em diferentes aplicações, tais como determinação de tipo sanguíneo, elucidação da estrutura e dinâmica de carboidratos presentes em superfícies celulares, diagnóstico de câncer e

purificação de glicoconjugados em escala preparativa (purificação de glicoproteínas) por cromatografia de afinidade (SATISH & SUROLIA, 2001).

O emprego de lectinas como ligantes de afinidade visando a purificação de glicoproteínas oferece vantagens em relação às condições de eluição. Devido à média afinidade entre carboidratos e lectinas ( $K_d$  da ordem de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  M), a molécula de interesse pode ser eluída sob condições brandas, conservando suas atividades biológicas. Por outro lado, quando se utilizam anticorpos específicos a carboidratos (alta afinidade,  $K_d$  da ordem de  $10^{-4}$  a  $10^{-8}$  M) como ligantes, condições severas de eluição são necessárias para se obter a molécula de interesse, podendo comprometer suas atividades biológicas (SATISH & SUROLIA, 2001). Dessa forma, a cromatografia de afinidade empregando lectinas é considerada uma técnica adequada para a purificação de glicoproteínas. Dentre as lectinas que apresentam potencial para esta aplicação, pode-se citar três em especial, a jacalina, a concanavalina A (con A) e a *Lens culinaris*, por terem sido utilizadas em estudos de purificação, de interação e de estrutura-função envolvendo moléculas de IgE e IgA.

A jacalina, lectina extraída de sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*), apresenta afinidade por D-galactose e N-acetil-galactosamina (KABIR, 1998). Trata-se de uma glicoproteína tetramérica com massa molecular de aproximadamente 66 kDa, em que cada uma de suas subunidades consiste de uma cadeia pesada de 133 aminoácidos e uma cadeia leve de 20 resíduos. Sua conformação é estabilizada por interações hidrofóbicas na parte central de cada subunidade e por um número pequeno de pontes de hidrogênio envolvendo átomos da cadeia principal e de cadeias laterais (LIS & SHARON, 1998). A jacalina tem a propriedade de se ligar tanto à IgA humana presente no soro, quanto àquela presente em secreções (ROQUE-BARREIRA & CAMPOS-NETO, 1985), com especificidade pela subclasse IgA<sub>1</sub> (KONDOH *et al.*, 1986). Imobilizada em agarose, a jacalina tem sido utilizada na purificação de IgA<sub>1</sub> humana (AUCOUTURIER & PREUDHOMME, 1988; HAUN *et al.*, 1989) e quando empregada com outras técnicas, rendimentos de até 95% foram alcançados (LOOMES *et al.*, 1991).

A con A, lectina isolada de sementes de *Canavalia ensiformis*, apresenta afinidade por manose e glicose. Sua molécula (massa molecular de aproximadamente 106 kDa) é composta de 4 subunidades idênticas formando um tetrâmero a pH 7,0, sendo que cada uma de suas subunidades possui massa molecular igual a 26,5 kDa. A pH 5,6, dois protômeros (52 kDa cada) são associados em um dímero. Cada subunidade da con A

contém um íon  $\text{Ca}^{2+}$  e um íon  $\text{Mn}^{2+}$ ; a remoção desses cátions interfere na ligação aos carboidratos e, conseqüentemente, nas propriedades biológicas da lectina (GOLDSTEIN & PORETZ, 1986).

Devido aos diferentes teores de carboidratos encontrados nas imunoglobulinas G (2-3%), A (7-11%), M (12%) e E (11-13%), a con A tem sido utilizada no fracionamento de imunoglobulinas de cabra (WEINSTEIN, GIVOL, STRAUSBAUCH, 1972) e de cães (PENG *et al.*, 1993). Imobilizada em Sepharose, a con A adsorveu 100% das moléculas de IgE e de IgM presentes em soro de cão, indicando seu potencial na purificação de tais imunoglobulinas (PENG *et al.*, 1993). A con A também apresentou afinidade por IgE e IgM humanas, adsorvendo 58% das moléculas de IgE e 63% das moléculas de IgM presentes em soro humano sadio; a porcentagem de adsorção foi maior ao se utilizar soro de pacientes com mieloma: 99% e 91% das moléculas de IgE e IgM foram adsorvidas em Sepharose-con A, respectivamente (RAY & RAYCHAUDHURI, 1982). A afinidade entre a con A e a IgE humana também foi investigada por SHIBASAKI e colaboradores (1992), que estudaram a interação entre 12 tipos de lectinas com IgE humana presente no soro de pacientes alérgicos. De todas as lectinas estudadas, os resultados indicaram que con A, *Lens culinaris* hemaglutinina, *Pisum sativum* aglutinina, *Ricinus communis* aglutinina I e fitohemaglutinina E apresentaram alta afinidade pela IgE humana.

A *Lens culinaris* (Lc), lectina isolada de sementes de lentilha (que também recebem o mesmo nome científico), apresenta dois sítios de adsorção por sacarídeos (STEIN, HOWARD, SAGE, 1972). Possui especificidade por manose e glicose, porém com menor afinidade do que a con A (LIENER, SHARON, GOLSTEIN, 1986). Composta de duas cadeias  $\alpha$  e duas  $\beta$ , a molécula da *Lens culinaris* é um tetrâmetro com massa molecular igual a 52,57 kDa (LORIS *et al.*, 1993).

Diante destes resultados, verifica-se o potencial de utilização de poliaminas, aminoácidos e lectinas visando a remoção seletiva de IgE do plasma de indivíduos atópicos, assim como a purificação desta imunoglobulina, buscando o emprego de adsorventes eficientes, seletivos e de menor custo.

## CAPÍTULO 3

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. PLANO DE TRABALHO

A metodologia deste trabalho foi dividida em três principais etapas, esquematizadas na Figura 3.1. A primeira etapa consistiu na seleção de adsorventes alternativos ao Sepharose-anti-IgE, visando dois tipos de aplicação: terapia de adsorção seletiva de IgE através de circulação extracorpórea e purificação de IgE. Esta seleção baseou-se em critérios, tais como, custo, capacidade de adsorção, seletividade e biocompatibilidade. Esses critérios (exceto o custo) foram avaliados por meio de experimentos de remoção de IgE e de consumo de C3 e C4 em frascos agitados, empregando-se os adsorventes agarose-*Lens culinaris* (agarose-Lc), Sepharose-concanavalina A (Sepharose-con A), agarose-D-triptofano (agarose-D-trp), agarose-poli-L-lisina (agarose-PLL), agarose-aminoxil (agarose-Ah) e amostras séricas. Selecionou-se o gel agarose-Lc para a terapia de adsorção seletiva de IgE através de circulação extracorpórea e o gel agarose-con A para a purificação de IgE. A segunda etapa consistiu na avaliação da influência de variáveis operacionais na adsorção de IgE em agarose-Lc, por meio de experimentos cromatográficos. Essa avaliação resultou na escolha das melhores condições experimentais para posterior aplicação deste adsorvente na simulação de uma circulação extracorpórea, a partir de amostras plasmáticas. A terceira etapa consistiu no emprego do gel Sepharose-con A para preparação de soluções enriquecidas em IgE a partir de amostras séricas, correspondendo a uma das etapas de um eventual processo de purificação de IgE. A estratégia para obtenção de soluções enriquecidas em IgE, consistiu em ensaios cromatográficos de afinidade empregando-se os géis agarose-jacalina e agarose-con A e, posteriormente, em ensaios cromatográficos de permeação em gel.

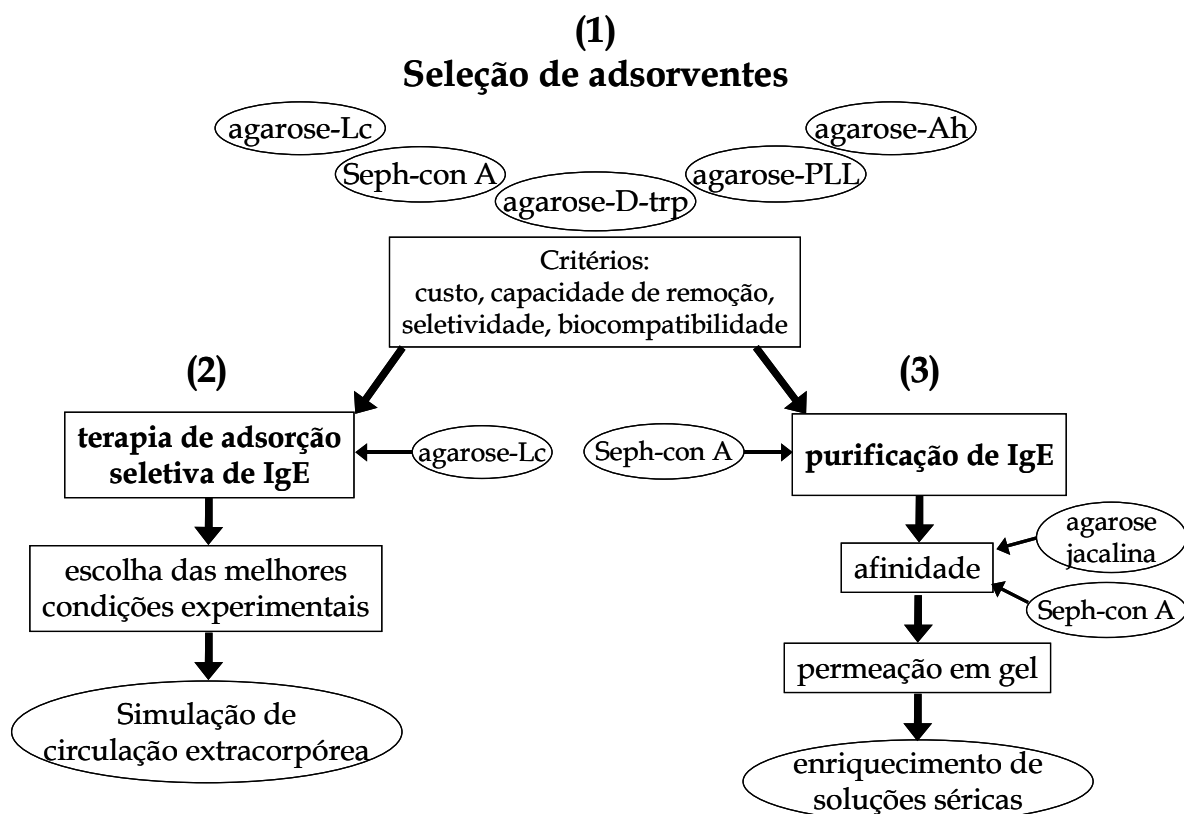


Figura 3.1: Fluxograma da metodologia geral. Principais etapas: (1) seleção de adsorventes (agarose-*Lens culinaris*, Sepharose-concanavalina A, agarose-D-triptofano, agarose-poli-L-lisina e agarose-aminohexil), (2) aplicação do gel agarose-*Lens culinaris* na simulação da circulação extracorpórea e (3) aplicação do gel Sepharose-concanavalina A no preparo de soluções enriquecidas em IgE.

## 3.2. MATERIAIS

### 3.2.1. Adsorventes

O gel Sepharose CL-4B (sem ligante imobilizado, suporte usado como controle) foi obtido da Amersham Biosciences (Suécia). As matrizes de afinidade agarose-con A, agarose-*Lens culinaris*, agarose-poli-L-lisina, agarose-D-triptofano e agarose-aminohexil foram obtidas da Sigma (EUA). O gel agarose-jacalina (adsorvente usado como controle) foi adquirido da Pierce (EUA). De acordo com os fabricantes, essas matrizes são constituídas de gel de agarose reticulada com epicloridrina (4% agarose) e ativada com brometo de cianogênio. As especificações desses adsorventes são apresentadas na Tabela 3.1. A coluna de permeação em gel Protein Pak 300 sw (7,5 mm x 30 cm) foi adquirida da Waters (Japão).

Tabela 3.1: Especificações dos adsorventes utilizados.\*

<b>Matriz</b>	<b>Densidade de ligantes imobilizados</b>	<b>Capacidade de adsorção</b>
agarose-con A	13 mg de lectina/mL gel	30 mg de tiroglobulina/mL gel
agarose- <i>Lens culinaris</i>	2,6 mg de lectina/mL gel	16 a 35 mg de tiroglobulina/mL gel
agarose-jacalina	4,5 mg lectina/mL gel	2 mg de IgA humana/mL gel
agarose-aminohexil	5 a 6 $\mu$ mol de diamino-hexano/mL gel	5 a 6 mg de albumina de soro bovino/mL gel
agarose-poli-L-lisina	1 a 2 mg de poliamina/mL gel	não fornecida
agarose-D-triptofano	1 a 3 $\mu$ mols de triptofano/mL gel	não fornecida

\* Fonte: Catálogos Sigma e Pierce (EUA)

### 3.2.2. Amostras de soro e plasma humanos

As amostras de soro e plasma humanos foram obtidas do banco de soros do Laboratório de Imunologia & Alergia Experimental (LIAE) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP, coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner.

### 3.2.3. Reagentes

Os seguintes reagentes foram utilizados na preparação dos tampões: cloreto de sódio, fosfato de sódio monobásico e dibásico, citrato de sódio, cloreto de manganês, cloreto de cálcio, acetato de sódio, álcool etílico e ácido acético glacial da LabSynth (Brasil); hidroximetil aminometano (Tris), glicina e etilenoglicol da Merck (Alemanha), metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo e melibiose da Sigma (EUA). Para evitar a proliferação de microrganismos, os adsorventes foram armazenados em solução de azida sódica ( $\text{NaN}_3$ , Merck, Alemanha). Solução salina 0,9% contendo heparina sódica (Cristália, Brasil) foi usada na preparação da coluna cromatográfica antes das injeções de amostras plasmáticas, para evitar a formação de fibrina, o que poderia danificar o adsorvente. Todos os demais reagentes utilizados no decorrer deste trabalho foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água ultrapura obtida do equipamento Milli Q (Millipore, EUA).



As análises de eletroforese foram efetuadas em dois tipos de equipamentos. O primeiro, Phast-System (Amersham Biosciences, Suécia), no qual utilizaram-se tiras de tampão de SDS (“buffer strip”) e gel de eletroforese de poliacrilamida (gradiente de concentração 4 a 15%) obtidos da Amersham Biosciences (Suécia). O segundo, o equipamento Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad, EUA), no qual usaram-se acrilamida (Bio-Rad, EUA) e bisacrilamida (Sigma, EUA) para preparação do gel de acrilamida de concentração 6,5%. Em ambas as análises foram utilizados marcadores de alta massa molecular (Amersham Biosciences, Suécia) e IgG humana de alta pureza (Aventis Behring, Alemanha).

Anticorpos de cabra anti-IgE humana “Eta Chain” (Serotec, EUA), anticorpos anti-IgG de cabra conjugados à peroxidase (Sigma, EUA), membrana de nitrocelulose (Schleicher & Schuell, EUA) e 3,3’ diaminobenzidina (Sigma, EUA) foram usados nas análises de “immunoblotting”.

Reagentes e calibradores de IgA, IgG, IgM, C3, C4 e albumina foram obtidos da Bio-Rad (EUA) para realização das análises de nefelometria.

As quantificações de IgE total e IgE’s específicas a *Dermatophagoides pteronyssinus* (IgE<sub>D1</sub>) e *Blomia tropicalis* (IgE<sub>D201</sub>) foram realizadas no equipamento UniCAP 100 (Pharmacia Diagnostics AB, Suécia). Os reagentes e calibradores necessários para esta quantificação foram adquiridos da Pharmacia Diagnostics AB (Suécia).

### 3.3. MÉTODOS

#### 3.3.1. Preparação das amostras de soro e plasma humanos

Amostras de sangue humano de indivíduos atópicos e não atópicos aos ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*, bem como de um indivíduo acometido de parasitose intestinal, foram coletadas ora sem anticoagulante (para obtenção de soro), ora com heparina sódica (para obtenção de plasma). Visando a obtenção de soro, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente em tubos de vidro por duas horas, para permitir a coagulação. Após a coagulação, estas amostras foram centrifugadas durante 10 min a 200 x g e o sobrenadante (soro) foi congelado a -10 °C ou a -80 °C, para posterior

utilização nos ensaios de remoção de IgE e consumo de C3<sup>3</sup> e C4<sup>4</sup> em frascos agitados e nos experimentos cromatográficos para preparo de soluções enriquecidas em IgE. Visando a obtenção de plasma, as amostras foram homogeneizadas imediatamente após a coleta e posteriormente centrifugadas durante 10 min a 200 x g. O sobrenadante (plasma) foi congelado a -10 °C para posterior utilização nos ensaios cromatográficos de simulação de circulação extracorpórea. Tanto as amostras de soro quanto as de plasma foram armazenadas no banco de soros do LIAE (FCM/UNICAMP).

### 3.3.2. Caracterização das amostras séricas e plasmáticas

Neste trabalho, as amostras foram classificadas em oito grupos: 1) “pool” de soros provenientes de indivíduos atópicos contendo concentrações altas de IgE total, IgE<sub>D1</sub> e IgE<sub>D201</sub>; 2) controle negativo A (CNA) proveniente de indivíduo não atópico contendo concentrações moderadas de IgE total e níveis indetectáveis de IgE<sub>D1</sub> e IgE<sub>D201</sub>; 3) soro controle negativo B (CNB) proveniente de indivíduo não atópico contendo níveis de IgE total, IgE<sub>D1</sub> e IgE<sub>D201</sub> indetectáveis; 4) soro-K proveniente de indivíduo atópico contendo concentrações moderadas de IgE total, IgE<sub>D1</sub> e IgE<sub>D201</sub>; 5) soro-G proveniente de indivíduo acometido de parasitose intestinal, contendo concentrações altas de IgE total; 6) soro fresco<sup>5</sup> proveniente de indivíduo não atópico contendo níveis de IgE total, IgE<sub>D1</sub> e IgE<sub>D201</sub> indetectáveis; 7) plasma-K proveniente de indivíduo atópico contendo concentrações moderadas de IgE total, IgE<sub>D1</sub> e IgE<sub>D201</sub> e 8) plasma controle negativo C (CNC) proveniente de indivíduo não atópico contendo níveis de IgE total, IgE<sub>D1</sub> e IgE<sub>D201</sub> indetectáveis. Neste trabalho, os níveis de IgE ditos indetectáveis, correspondem àqueles indetectáveis pela metodologia de Fluoroenzimaimunoensaio (equipamento UniCAP 100, Pharmacia Diagnostics AB, Suécia). Na Tabela 3.2 é apresentada a caracterização destas amostras em relação às IgE's total e específicas, bem como IgA, IgG, IgM, albumina, C3 e C4.

---

<sup>3</sup> C3: proteína mais abundante do complemento, que pode ser degradada espontaneamente ou pela enzima C3 convertase (após a ativação do complemento), gerando os produtos C3a e C3b (ABBAS *et al.*, 2000).

<sup>4</sup> C4: proteína do complemento que pode ser clivada pela enzima C1s, gerando C4b (ativação da via clássica do complemento) (ABBAS *et al.*, 2000).

<sup>5</sup> Soro fresco: soro humano separado imediatamente após coleta do sangue total e congelado à temperatura de - 80 °C evitando-se consumo espontâneo de componentes do sistema complemento.

Tabela 3.2: Níveis de IgE total, IgE's específicas a *Dermatophagoides pteronyssinus* (IgE<sub>D1</sub>) e *Blomia tropicalis* (IgE<sub>D201</sub>), IgA, IgG, IgM, albumina, C3 e C4 presentes nas amostras séricas e plasmáticas.

Proteína quantificada	Amostras séricas						Amostras plasmáticas	
	"pool"	CNA*	CNB*	soro-K	soro-G	soro fresco	plasma-K	CNC*
IgE total (kU/L)	1437	133	< 2,00	180	1048	< 2,00	174	< 2,00
IgE <sub>D1</sub> (kUA/L)	253	< 0,35	< 0,35	51,3	**	< 0,35	34	< 0,35
IgE <sub>D201</sub> (kUA/L)	70	< 0,35	< 0,35	11,9	**	< 0,35	12,2	< 0,35
IgA (mg/mL)	1,73	2,77	0,983	0,64	4,89	3,42	0,75	1,27
IgG (mg/mL)	12,90	8,32	12,40	11,4	16,00	12,30	13,8	15,1
IgM (mg/mL)	1,62	0,673	1,98	0,94	1,14	2,35	1,07	2,48
albumina (mg/mL)	45,80	44,00	40,30	34,10	34,10	39,3	43,8	43,9
C3 (mg/dL)	**	**	**	**	**	83,7	**	**
C4 (mg/dL)	**	**	**	**	**	15,6	**	**

\* CNA: controle negativo A; CNB = controle negativo B; CNC = controle negativo C.

\*\* Concentrações não determinadas.

### 3.3.3. Dosagem das concentrações de IgG, IgA, IgM, albumina, C3 e C4

A dosagem das concentrações de IgG, IgA, IgM, albumina, C3 e C4 presentes nas amostras séricas e plasmáticas do banco de soros, nas amostras dos experimentos em batelada e cromatográficos foram determinadas por nefelometria, conforme descrito no manual do nefelômetro Array Protein System 360 (Beckman Coulter, EUA). O princípio do método baseia-se no espalhamento da luz obtida por partículas (complexos) em suspensão na solução medida quando esta é submetida a um raio luminoso incidente. Essas partículas são formadas por reação de imunoprecipitação que ocorre quando o anticorpo específico entra em contato com o antígeno, resultando na formação de complexos. A variação da intensidade do espalhamento de luz é medida pelo nefelômetro e convertida

em unidades de concentração (mg/dL). As concentrações mínimas detectadas pelo equipamento são de 1,11 mg/dL, 0,93 mg/dL, 0,69 mg/dL, 0,62 mg/dL, 0,97 mg/dL e 1,27 mg/dL para IgA, IgG, IgM, albumina, C3 e C4, respectivamente.

#### 3.3.4. Quantificação de IgE

Pela metodologia de Fluoroenzimaimunoensaio (FEIA) quantificou-se as imunoglobulinas E de amostras séricas e plasmáticas do banco de soros e de frações obtidas dos experimentos em batelada e cromatográficos. O procedimento foi realizado no LIAE (FCM/UNICAMP), de acordo com o protocolo do equipamento UniCAP 100 (Pharmacia Diagnostics AB, Suécia).

O método possui o seguinte princípio: o antígeno (anti-IgE) é acoplado covalentemente ao ImmunoCAP (microcubas nas quais ocorrerá a reação). Durante a primeira incubação, as moléculas de IgE presentes no soro ligam-se à camada de antígenos. As microcubas são posteriormente lavadas com tampão para remover os componentes do soro que não se ligaram aos antígenos. Na segunda incubação, um conjugado de enzima-anticorpo monoclonal do tipo anti-IgE é adicionado e liga-se às imunoglobulinas E fixadas aos antígenos nas placas, formando um complexo ternário. Após nova etapa de lavagem, as imunoglobulinas E são identificadas mediante incubação com solução de substrato da enzima conjugada, que fornecerá o desenvolvimento de fluorescência. A reação é interrompida por solução bloqueadora, e a fluorescência é medida. A fluorescência é proporcional à quantidade de IgE presente na amostra. A concentração de IgE é estimada por interpolação da curva de calibração realizada com calibradores padronizados. Os resultados são obtidos em unidade internacional de anticorpo kU/L para IgE total e kUA/L para IgE específica, sendo as faixas de detecção de 2 a 5000 kU/L e 0,35 a 100 kUA/L, respectivamente.

#### 3.3.5. Quantificação de proteínas totais

As concentrações de proteínas totais nos experimentos cromatográficos realizados com amostras séricas e plasmáticas do banco de soros foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976), utilizando albumina de soro bovino como proteína de referência.

### 3.3.6. Experimentos de remoção de IgE em frascos agitados para seleção de adsorventes

Os experimentos em frascos agitados foram conduzidos como descrito em IKONOMOV e colaboradores (1992), utilizando-se tubos de polipropileno de capacidade de 1,5 mL. As amostras séricas usadas foram o “pool” e os controles negativos A e B. Inicialmente, foram introduzidos 250 µL de adsorvente no tubo e, após sedimentação e remoção de excesso de tampão PBS (tampão fosfato de sódio 10 mM contendo NaCl 0,15 M, pH 7,4), a massa deste adsorvente foi determinada. Pipetou-se uma quantidade de amostra sérica neste tubo, seguindo-se a proporção massa de adsorvente por massa de amostra sérica 1:2. Em seguida, o tubo foi incubado durante 120 min a 37°C em um banho com agitação branda. Após incubação, o sobrenadante foi recuperado por centrifugação (Microcentrífuga Microprocessa de Bancada, NT800, Novatécnica, Brasil), à aceleração de 1500 x g e à temperatura de 25 °C, durante 20 min. Fez-se a quantificação de IgG, IgA, IgM e albumina por nefelometria e de IgE total e IgE's específicas por FEIA. Cada adsorvente foi testado em triplicata. Os resultados obtidos foram expressos em termos dos valores médios e desvios padrão das porcentagens de remoção (%R) de IgE total, IgE<sub>D1</sub>, IgE<sub>D201</sub>, IgA, IgG, IgM e albumina, calculadas de acordo com a Equação 1 (Eq. 1) (IKONOMOV *et al.*, 1992):

$$\%R = \frac{(Q_{si} - Q_{sf})}{Q_{si}} \times 100 \quad (1)$$

na qual  $Q_{si}$  é a massa de IgE total, IgE<sub>D1</sub>, IgE<sub>D201</sub> (kU), IgA, IgG, IgM ou albumina (mg) presente na amostra sérica inicial (antes da incubação) e  $Q_{sf}$  é a massa de IgE total, IgE<sub>D1</sub>, IgE<sub>D201</sub> (kU), IgA, IgG, IgM ou albumina (mg) presente na amostra sérica final (sobrenadante após incubação).

Os resultados foram comparados utilizando-se o teste Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ .

### 3.3.7. Experimentos de consumo de C3 e C4 em frascos agitados para seleção de adsorventes

Os ensaios de consumo de C3 e C4 foram similares aos descritos no item 3.3.6., diferindo apenas na temperatura (4°C), na amostra sérica (soro fresco) e no tempo de

incubação (60 minutos). De acordo com CHEUNG & LEMKE (1994), mesmo na ausência de adsorvente podem ocorrer alterações espontâneas no soro (ativação de proteínas), as quais devem sempre ser consideradas e incluídas como controles. Portanto, nestes experimentos, os controles constituíram-se de 500 µL de soro fresco, que foram incubados na ausência de adsorvente. Os resultados obtidos foram expressos em termos da porcentagem de consumo (%c) de C3 e C4 em relação ao soro controle, calculadas de acordo com a Equação 2 (Eq. 2):

$$\%c = \frac{(Q_{sc} - Q_{ads})}{Q_{sc}} \times 100 \quad (2)$$

na qual  $Q_{sc}$  é a massa de C3 ou C4 (mg) presente no soro controle (após incubação) e  $Q_{ads}$  é a massa de C3 ou C4 (mg) presente no sobrenadante após incubação com cada adsorvente.

### 3.3.8. Experimentos cromatográficos de simulação de circulação extracorpórea

Os ensaios cromatográficos de simulação de circulação extracorpórea foram realizados em um sistema de cromatografia de baixa pressão (Econo Liquid Chromatography System, BioRad, EUA), empregando-se o gel agarose-*Lens culinaris* empacotado nas colunas A (10 cm x 5 mm I.D., Amersham Biosciences, Suécia) e B (10 cm x 10 mm I.D., Amersham Biosciences, Suécia) fornecendo volumes de leito de 0,8 mL e 1,6 mL, respectivamente. Dois ensaios controle foram realizados utilizando-se o gel Sepharose (sem ligante imobilizado) empacotado na coluna A. A amostra plasmática era injetada na coluna por meio de uma bomba peristáltica. A corrente de saída da coluna passava por um monitor de medida de absorvância a 280 nm, cujos sinais eram emitidos continuamente a um registrador, que traçava um cromatograma referente aos dados obtidos. As frações (1,0 mL) eram recolhidas em tubos de polipropileno inseridos no coletor de frações. Um esquema da montagem experimental é mostrado na Figura 3.2.

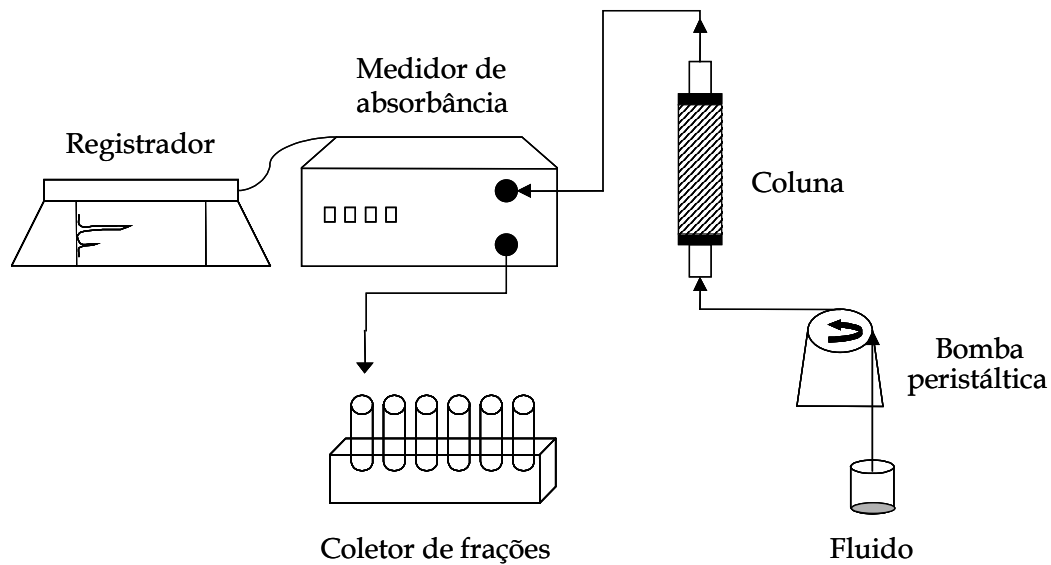


Figura 3.2: Esquema da montagem experimental: sistema de cromatografia de baixa pressão.

Cada ensaio cromatográfico consistia em três etapas: 1) preparação, 2) adsorção e 3) dessorção. Na etapa de preparação, a coluna foi equilibrada com tampão PBS 10 mM pH 7,4 e em seguida, injetou-se 3,0 mL de solução salina 0,9% contendo heparina sódica, correspondendo a recomendações para o procedimento clínico (AVENHAUS *et al.*, 2002). Na etapa de adsorção, dependendo do experimento, as amostras plasmáticas foram injetadas na coluna, correspondendo a uma passagem do plasma, ou foram alimentadas e circuladas pela coluna durante 68 e 102 minutos, correspondendo a duas e três passagens do plasma, respectivamente (Figura 3.3). Posteriormente, a coluna foi lavada com tampão PBS com o objetivo de eliminar as proteínas não adsorvidas. A esta solução de lavagem foi adicionado citrato de sódio 18 mM para prevenir a formação de fibrina no interior da coluna (AVENHAUS *et al.*, 2002). A etapa de dessorção foi realizada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4, contendo cloreto de sódio 0,5 M, metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo 0,5 M e citrato de sódio 18 mM. Após esta etapa, a coluna foi lavada três vezes alternadamente com Tris-HCl 20 mM pH 8,5 e acetato de sódio 20 mM pH 4,5, ambos contendo cloreto de sódio 0,5 M. Finalizado o experimento, as concentrações de IgE total e específica, IgA, IgG, IgM e albumina das amostras plasmáticas, das frações de lavagem e de eluição, foram determinadas por FEIA e nefelometria.

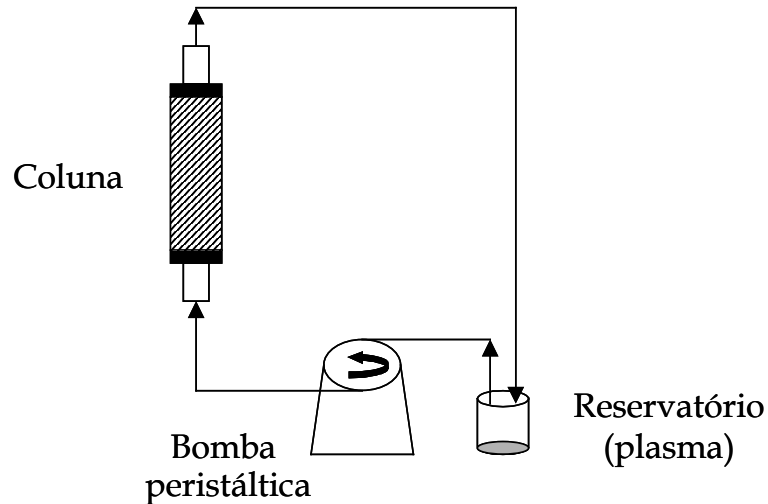


Figura 3.3: Esquema da montagem experimental para circulação de plasma pela coluna agarose-*Lens culinaris*.

A seguir, dois procedimentos cromatográficos diferentes serão descritos. O primeiro visou investigar os efeitos de algumas variáveis operacionais na adsorção de IgE; o segundo objetivou estudar o desempenho do gel agarose-*Lens culinaris* em uma simulação de circulação extracorpórea, empregando as condições experimentais selecionadas anteriormente.

### 3.3.8.1. Procedimento para estudo de efeitos de algumas variáveis operacionais na adsorção de IgE

Seis ensaios foram realizados variando-se velocidade superficial  $v$  (cm/min), número de passagens de plasma pela coluna  $npp$ , razão entre volume de plasma ( $v_p$ ) e volume de leito ( $v_l$ ) e temperatura ( $T$ ), cujos valores são descritos na Tabela 3.3. Nos ensaios 1, 2, 5 e 6 o plasma-K foi injetado na coluna sem circulação. Nos ensaios 3 e 4, a etapa de adsorção consistiu na circulação do plasma-K pela coluna em circuito fechado (Figura 3.3), em que  $npp$  corresponde ao número de passagens do plasma pela coluna.



Tabela 3.3: Variáveis operacionais testadas em seis ensaios cromatográficos com gel agarose-*Lens culinaris*\*.

Ensaio	Volume da amostra (mL)	Variáveis operacionais			
		v (cm/min)	npp	vp/vl	T (°C)
1	4,56	0,26	1	5,70	25
2	4,56	0,78	1	5,70	25
3	4,56	0,78	2**	5,70	25
4	4,56	0,78	3**	5,70	25
5	2,28	0,78	1	2,85	25
6	2,28	0,78	1	2,85	37

\* coluna cromatográfica A (10 cm x 5 mm I.D.)

\*\* ensaios com circulação do plasma

Finalizado o experimento, as concentrações de IgE total, IgE<sub>D1</sub>, IgA, IgG, IgM e albumina das amostras plasmáticas, das frações de lavagem e de eluição, foram determinadas por FEIA e nefelometria. A adsorção destas proteínas foi expressa como porcentagens de adsorção (%A) de IgE total, IgE<sub>D1</sub>, IgA, IgG, IgM e albumina, calculadas de acordo com a Equação 3 (Eq. 3):

$$\%A = \frac{Q_{\text{elu}}}{Q_{\text{pi}}} \times 100 \quad (3)$$

na qual  $Q_{\text{elu}}$  é a massa de IgE total, IgE<sub>D1</sub> (kU), IgA, IgG, IgM ou albumina (mg) eluída e  $Q_{\text{pi}}$  é a massa de IgE total, IgE<sub>D1</sub> (kU), IgA, IgG, IgM ou albumina (mg) presente na amostra plasmática inicial.

Os ensaios controle foram realizados injetando-se na coluna de Sepharose ora o plasma-K, ora o controle negativo C, nas mesmas condições experimentais do ensaio 2 (Tabela 3.3).

Para verificar se a presença de IgE total influencia na adsorção das imunoglobulinas A, G e M em agarose-*Lens culinaris*, realizou-se um ensaio cromatográfico com o controle negativo C nas mesmas condições do ensaio 2 (Tabela 3.3). As

porcentagens de adsorção de IgA, IgG, IgM e albumina (Eq. 3) foram comparadas com aquelas obtidas no ensaio 2.

### 3.3.8.2. Sistema para simulação de circulação extracorpórea

Nesses ensaios, os valores das variáveis operacionais foram mantidos constantes ( $v$ , 0,78 cm/min; npp, 1; vp/vl, 2,85; T, 25 °C). A etapa de adsorção consistiu na circulação do plasma-K pela coluna B durante 11 min, correspondendo a uma passagem do plasma através da coluna. Ao término da circulação, as IgE's remanescentes na solução do reservatório foram dosadas por FEIA e IgA, IgG, IgM e albumina foram quantificadas por nefelometria. Os ensaios foram realizados em duplicata. Os resultados obtidos foram expressos em termos dos valores médios e desvios padrão das porcentagens de remoção (%R) de IgE total, IgE<sub>D1</sub>, IgE<sub>D201</sub>, IgA, IgG, IgM e albumina, calculadas de acordo com a Eq. 1. O circuito fechado foi aberto e a coluna foi exaustivamente lavada para remover as proteínas não adsorvidas e, em seguida, a etapa de eluição foi conduzida como descrito anteriormente. As concentrações de proteínas nas frações de lavagem e eluição foram determinadas para cálculo de balanço de massa.

### 3.3.9. Eletroforese SDS-PAGE no equipamento Phast-System

Com as frações de injeção, lavagem e eluição obtidas na cromatografia de plasma humano em gel agarose-*Lens culinaris*, fez-se eletroforese para detectar as proteínas presentes. A eletroforese SDS-PAGE ("Sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis") sob condições desnaturantes e não redutoras foi realizada em equipamento Phast-System (Amersham Biosciences, Suécia) utilizando-se gel de poliacrilamida com gradiente de concentração de 4 a 15%, conforme procedimento sugerido pelo fabricante. As amostras foram preparadas adicionando-se solução de dodecil sulfato de sódio 10% a elas e, em seguida, aquecendo-as a 100 °C por 7 min. A coloração do gel foi feita com nitrato de prata, de acordo com o protocolo descrito no manual que acompanha o equipamento.

### 3.3.10. Experimentos cromatográficos para obtenção de solução enriquecida em IgE

#### 3.3.10.1. Ensaios cromatográficos empregando géis de afinidade

Os experimentos cromatográficos foram realizados em um sistema de cromatografia de baixa pressão (Econo Liquid Chromatography System, BioRad, EUA) a 25 °C e à vazão de 0,3 mL/min. Duas colunas cromatográficas (10 cm x 10 mm I.D., Amersham Biosciences, Suécia) foram montadas em série e empacotadas com 3,0 mL de leito de adsorvente, a primeira com agarose-jacalina e a segunda com Sepharose 4B-con A. A finalidade da primeira coluna era adsorver IgA<sub>1</sub>, uma vez que o gel agarose-jacalina é utilizado na purificação desta imunoglobulina proveniente de soro humano e de secreções (AUCOUTURIER & PREUDHOMME, 1988; HAUN *et al.*, 1989). A finalidade da segunda coluna era adsorver predominantemente IgE e IgM, ocorrendo a passagem direta das outras proteínas. O soro-K (ou o soro-G) era injetado na primeira coluna por meio de uma bomba peristáltica, sendo que a corrente de saída desta coluna alimentava a segunda coluna simultaneamente. A corrente de saída da segunda coluna passava por um monitor de medida de absorbância a 280 nm, cujos sinais eram emitidos continuamente a um registrador, que traçava um cromatograma referente aos dados obtidos. As frações eram recolhidas em tubos de ensaio inseridos no coletor de frações. Um esquema da montagem experimental é mostrado na Figura 3.4.

Inicialmente, as colunas contendo os adsorventes agarose-jacalina e Sepharose 4B-con A respectivamente, foram equilibradas com tampão de equilíbrio PBS 0,1 M (fosfato de sódio contendo NaCl 0,15 M) pH 7,4. A primeira coluna foi alimentada com 3,0 mL de soro-K ou soro-G (evitando-se a saturação da mesma em IgA) e em seguida, lavada com tampão de equilíbrio até que a absorbância atingisse valor próximo a zero. As colunas foram desconectadas para realização da etapa de dessorção, uma vez que cada adsorvente deve ser eluído com seu tampão apropriado. Para a eluição da coluna agarose-jacalina, utilizou-se PBS 0,1 M pH 7,4, contendo melibiose 0,1 M e para a eluição da Sepharose 4B-con A, empregou-se Tris-HCl 20 mM pH 7,4, contendo NaCl 0,5 M e metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo 0,5 M. Após a etapa de eluição, a coluna Sepharose 4B-con A foi lavada três vezes alternadamente com Tris-HCl 20 mM pH 8,5 e acetato de sódio 20 mM pH 4,5, ambos contendo cloreto de sódio 0,5 M. A regeneração da coluna foi finalizada com etanol 20% e, em seguida, a mesma foi equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4, contendo CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM e NaCl 0,5 M. As frações de interesse (aquelas eluídas

da coluna Sepharose 4B-con A) foram agrupadas e posteriormente dialisadas e concentradas por evaporação. Esta solução foi denominada como “solução enriquecida em IgE”.

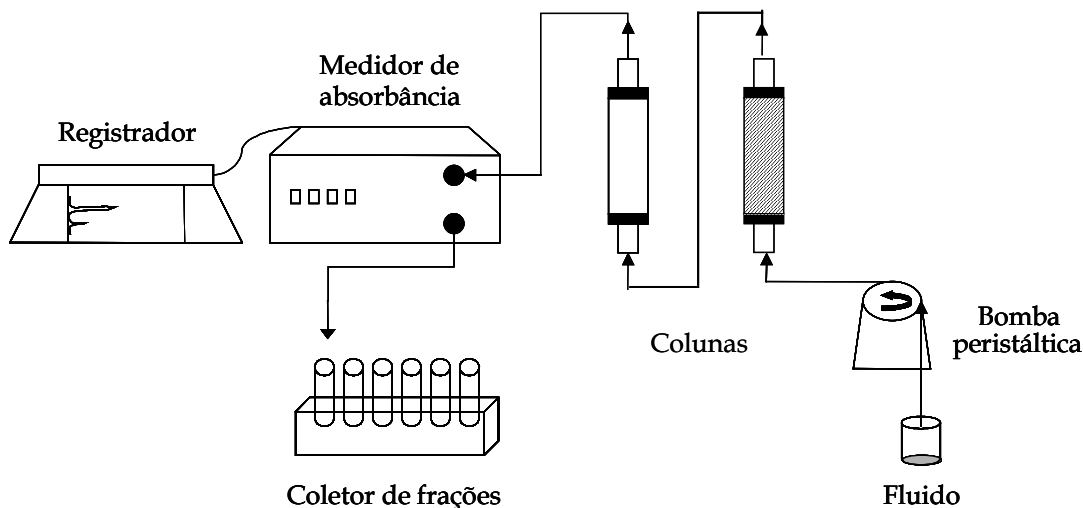


Figura 3.4: Esquema da montagem experimental: sistema de cromatografia de baixa pressão com as colunas em série agarose-jacalina (hachurada) e Sepharose 4B-con A (não-hachurada).

Finalizado o experimento, quantificou-se IgE total por FEIA e IgG, IgA, IgM e albumina por nefelometria, presentes na amostra de injeção, nas frações de lavagem e eluição e na solução enriquecida em IgE. Os resultados obtidos foram expressos em termos de porcentagem de recuperação de IgE ( $\% \text{Recup}_{\text{IgE}}$ ) e de fator de enriquecimento em IgE em relação aos isotipos IgA, IgG, IgM e à albumina (FE), calculados de acordo com as Equações 4 (Eq. 4) e 5 (Eq. 5):

$$\% \text{Re cup}_{\text{IgE}} = \frac{E_{\text{IgE}}}{I_{\text{IgE}}} \times 100 \quad (4)$$

na qual  $E_{\text{IgE}}$  é a massa de IgE (mg) presente na solução enriquecida em IgE e  $I_{\text{IgE}}$  é a massa de IgE (mg) presente na amostra de injeção.

$$FE = \frac{E_{\text{Relat}}}{I_{\text{Relat}}} \quad (5)$$

sendo:

$$E_{\text{Relat}} = \frac{E_{\text{IgE}}}{E_{\text{IgE}} + E_{\text{Ig}} + E_{\text{Alb}}} \times 100 \quad (6)$$

na qual  $E_{\text{Relat}}$  é a porcentagem em massa de IgE total em relação a IgA, IgG, IgM e albumina, presente na solução enriquecida em IgE,  $E_{\text{Ig}}$  é a soma das massas de IgA, IgG e IgM (mg) presentes na solução enriquecida em IgE,  $E_{\text{Alb}}$  é a massa de albumina (mg) presente na solução enriquecida em IgE;

$$I_{\text{Relat}} = \frac{I_{\text{IgE}}}{I_{\text{IgE}} + I_{\text{Ig}} + I_{\text{Alb}}} \times 100 \quad (7)$$

na qual  $I_{\text{Relat}}$  é a porcentagem em massa de IgE total em relação a IgA, IgG, IgM e albumina, presente na amostra de injeção,  $I_{\text{Ig}}$  é a soma das massas de IgA, IgG e IgM (mg) presente na amostra de injeção,  $I_{\text{Alb}}$  é a massa de albumina (mg) presente na amostra de injeção.

### 3.3.10.2. Cromatografia de permeação em gel de alto desempenho (HPGPC)

Os experimentos de HPGPC foram realizados em um sistema HPLC da Waters (EUA), constituído de um sistema de bombas binário modelo 1525, detector de absorvância modelo 2487 e um computador Compaq com software Breeze versão 3.20. Utilizou-se a coluna de permeação em gel Protein Pak 300 sw (Waters, Japão), volume de leito igual a 13,25 mL, constituída de grupos diol imobilizados em sílica gel, com tamanho médio de partículas de 10  $\mu\text{m}$ . Esta coluna é adequada para separar proteínas globulares na faixa de massa molecular de 10 kDa a 400 kDa. As injeções (200  $\mu\text{L}$ ) foram realizadas a 25 °C e às vazões de 0,5 mL/min ou 0,25 mL/min, dependendo do experimento. As amostras de injeção (solução enriquecida em IgE) foram previamente filtradas em filtros PVDF-Millex-HV (Millipore, EUA) de diâmetro de poro igual a 0,45  $\mu\text{m}$ . A eluição das

proteínas foi realizada com a fase móvel tampão PBS 0,1 M pH 7,4, sendo detectadas a 280 nm.

Ao término do experimento, quantificou-se IgE total por FEIA e IgG, IgA, IgM e albumina por nefelometria, presentes na amostra de injeção e nas frações de eluição. Os resultados obtidos foram expressos em termos de porcentagem de recuperação de IgE (%Recup<sub>IgE</sub>) e de fator de enriquecimento em IgE em relação aos isotipos IgA, IgG, IgM e à albumina (FE), calculados de acordo com as Equações 4 e 5. A fração de eluição rica em IgE foi denominada como “solução final enriquecida em IgE”. As frações de injeção e de eluição também foram analisadas por “immunoblotting”.

### 3.3.11. Diálise

A diálise foi realizada para remover metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo presente nas frações de eluição dos experimentos cromatográficos de afinidade visando obtenção de solução enriquecida em IgE. Estas frações foram agrupadas e dialisadas em sacos de diálise de celulose regenerada com tamanho nominal de corte de 12–16 kDa (Interlab, Brasil), por 65 horas, sob agitação, contra 4,0 L de tampão PBS 0,1 M, pH 7,4 (ensaio a partir do soro-K) ou 5,0 L (ensaio a partir do soro-G), trocados 3 vezes.

### 3.3.12. Evaporação a vácuo

A evaporação a vácuo foi realizada para concentrar as frações de eluição (previamente agrupadas e dialisadas) obtidas a partir da cromatografia de afinidade visando obtenção de solução enriquecida em IgE, para serem utilizadas na HPGPC. As frações foram concentradas no Evaporador RC10-10T (Jouan, Saint-Herblain, França), sendo o volume reduzido 6,7 vezes (ensaio a partir do soro-K) ou 25 vezes (ensaio a partir do soro-G).

### 3.3.13. Análise microscópica de cristais

Os cristais formados após a evaporação foram analisados em microscópio ótico trinocular modelo TIM-108 (Anatomic, Brasil), utilizando-se aumento de 100 vezes. Para verificar se os cristais observados ao microscópio ótico eram cristais de proteína ou

inorgânicos (decorrentes de sais ou carboidratos em solução), estes foram corados com reagente azul (Izit Cristal Dye, Hampton Research, EUA). Este reagente cora especificamente cristais macromoleculares, não alterando cristais inorgânicos ou de moléculas menores. Pipetou-se 2  $\mu$ L de Izit Cristal Dye sobre o cristal e, após 1 h de repouso, visualizou-se o mesmo em microscópio.

#### 3.3.14. “Immunoblotting”

Inicialmente, fez-se a separação eletroforética por SDS-PAGE das amostras dos experimentos de HPGPC sob condições desnaturantes e não redutoras. A eletroforese foi realizada no equipamento Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad, EUA), com gel de poliacrilamida de concentração 6,5% e espessuras iguais a 0,75 e 1,5 mm. O gel de espessura igual a 0,75 mm foi revelado com nitrato de prata (MORRISSEY, 1981) para posterior comparação, enquanto que o gel de espessura igual a 1,5 mm foi utilizado para o “immunoblotting”.

Após a separação por SDS-PAGE no gel de espessura igual a 1,5 mm, as proteínas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose utilizando-se o sistema semi-seco de transferência (SCIE-PLAS, Inglaterra), seguindo-se basicamente o método de TOWBIN, STAEHELIN, GORDON (1979) com adaptações do LIAE (FCM/UNICAMP). As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,45  $\mu$ m (Schleicher & Schuell, EUA) aplicando-se 75 mA e 50 V durante 90 min em tampão de transferência (Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,037%, metanol 20%). Após a transferência, o gel de acrilamida foi rapidamente corado com Coomassie Blue 0,1% (Bio-Rad, EUA), ácido acético 10% e metanol 40%, para verificar a eficiência da transferência. A tira correspondente ao marcador de massa molecular foi cortada da membrana e também corada com Coomassie Blue.

Em seguida, a membrana foi incubada em tampão PBS-T-Mo (PBS pH 7,4 contendo leite desnatado a 1% (Molico, Nestlé) e Tween 20 a 0,05%) durante 60 min a temperatura ambiente, para bloqueio dos sítios ligantes de proteínas. A membrana foi imersa em solução contendo o anticorpo primário (anticorpo de cabra anti-IgE humana, Serotec, EUA) diluído na proporção 1:200 em PBS-T-Mo e incubada por 30 min à temperatura ambiente (agitação branda) e por 17 h a 4 °C (sem agitação). Posteriormente a

membrana foi lavada 3 vezes com tampão PBS-T (PBS pH 7,4 contendo Tween 20 a 0,05%) e incubada com o anticorpo secundário (anticorpo anti-IgG de cabra conjugado à peroxidase) diluído na proporção 1:5.000 em PBS-T-Mo. Após a remoção do anticorpo secundário por lavagens sucessivas com PBS-T, a membrana foi incubada (na ausência de luz) com solução de 3,3' diaminobenzidina 0,05%, sulfato de níquel 0,025% e cloreto de cobalto 0,025% em PBS durante 15 min. A revelação das bandas foi obtida pela adição de água oxigenada 5%, sendo interrompida pela lavagem da membrana com água destilada.



## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1. SELEÇÃO DE SUPORTES ALTERNATIVOS À AGAROSE-ANTI-IgE PARA ADSORÇÃO DE IgE

##### 4.1.1. Critérios para seleção de adsorventes

A seleção de adsorventes objetivou escolher o(s) mais adequado(s) para as seguintes aplicações: 1) remoção de IgE por circulação extracorpórea em casos de emergências alérgicas (terapia de adsorção seletiva) e 2) obtenção de solução enriquecida em IgE a partir de soro humano, como uma das etapas do processo de purificação de IgE.

As características ideais que um adsorvente deve apresentar para remoção de IgE do plasma de pacientes atópicos são:

- 1º. O ligante deve apresentar afinidade por IgE ou por IgE's específicas (ser seletivo);
- 2º. Ser disponível no mercado ou facilmente derivatizado em laboratórios comerciais;
- 3º. Apresentar baixo custo, o que implica em aumento da viabilidade de aplicação clínica. Ligantes bioespecíficos de especificidade de grupo ou pseudobioespecíficos apresentam menor custo que o anticorpo anti-IgE humana, além de ser mais fácil a imobilização na matriz sólida;
- 4º. Apresentar alta capacidade de adsorção de IgE total ou IgE's específicas;
- 5º. Apresentar baixa capacidade de adsorção de IgG, IgA, IgM e albumina humana;
- 6º. Ser biocompatível, não provocando a ativação do complemento durante o tratamento extracorpóreo;
- 7º. Ser estável quimicamente em uma larga faixa de pH e resistir a procedimentos de limpeza utilizados na etapa de regeneração do adsorvente;
- 8º. Ser estável fisicamente apresentando rigidez mecânica e estabilidade aos processos de esterilização;

9º. Ser hidrofílico, prevenindo a adsorção não-específica que é passível de ocorrer devido a interações hidrofóbicas.

Esses critérios também são válidos para a seleção de adsorventes a serem utilizados em etapas intermediárias do processo de purificação de IgE, exceto o sexto item. Dentre esses critérios, os seis primeiros foram investigados com o objetivo de selecionar um ou mais adsorventes para aplicação em ambos os processos objetivados neste trabalho, à exceção do sexto (biocompatibilidade), que só se aplica à terapia de adsorção seletiva. O sétimo critério não foi estudado, uma vez que se empregaram procedimentos para a regeneração dos adsorventes, sugeridos pelos respectivos fabricantes. O oitavo critério também não foi investigado neste trabalho, pois a matriz dos adsorventes escolhida, a agarose, é conhecida por sua estabilidade química e mecânica, sendo já empregada como matriz de colunas de afinidade contendo proteína A ou anticorpos anti-IgG imobilizados, usadas clinicamente em alguns países da Europa, no tratamento de doenças autoimunes (coluna Immunosorba, Fresenius, Alemanha; Ig-Therasorb, Plasmaselect, Alemanha), sendo, portanto, resistentes aos processos de esterilização. Em relação ao nono critério, dentre os materiais usados como matrizes de afinidade para aplicações biomédicas (por exemplo, circulação extracorpórea), a agarose é um dos mais hidrofílicos e, quando reticulada, apresenta elevada estabilidade química e mecânica.

#### 4.1.2. Aplicação dos critérios para seleção de adsorventes

Para satisfazer o primeiro critério (seletividade), optou-se por selecionar ligantes que tivessem sido relatados em literatura como promissores para a purificação de IgE humana ou que apresentassem afinidade por esta proteína. Com base em dados de literatura, selecionaram-se os seguintes ligantes para estudo:

- a) Concanavalina A, pois esta apresenta alta afinidade por IgE humana e alta capacidade de adsorção (RAY & RAYCHAUDHURI, 1982; SHIBASAKI *et al.*, 1992);
- b) *Lens culinaris* que apresenta alta afinidade por IgE humana (SHIBASAKI *et al.*, 1992);
- c) D-triptofano, capaz de adsorver IgE humana do plasma de pacientes com doenças auto-imunes (BEHM *et al.*, 1987, IKONOMOV *et al.*, 1992);

- d) Poli-L-lisina, que interage especificamente com IgE humana (interação poliamina-IgE) (ZHAO *et al.*, 2000);
- e) Aminohexil, por apresentar interação com IgE humana (interação amina-IgE) (ZHAO *et al.*, 2000).

Uma vez selecionados os ligantes a partir de dados da literatura, para serem possíveis candidatos às aplicações em estudo, verificou-se que os mesmos eram disponíveis comercialmente, já imobilizados em agarose, atendendo ao segundo critério. Como os ligantes selecionados são bioespecíficos de especificidade de grupo ou pseudobioespecíficos, quando comparado ao anticorpo anti-IgE humana, o custo não é elevado. O valor dos adsorventes selecionados (ligante imobilizado em gel de agarose) varia de U\$28,30 a U\$168,50 o frasco contendo 5 mL (Catálogo Sigma, 2005). O valor comercial de 0,5 mg de anticorpos de cabra anti-IgE humana (sem estar imobilizados no suporte) é aproximadamente 300 dólares, segundo o revendedor autorizado da marca Serotec (2005). Para preparar 5 mL de adsorvente Sepharose-anti-IgE, necessita-se de aproximadamente 2,5 mg de anticorpo (KLEINE-TEBBE *et al.*, 1995) e 5 mL de Sepharose ativada com brometo de cianogênio, cujo valor comercial é aproximadamente U\$220 (revendedor autorizado da marca Amersham Biosciences, 2005), ou seja, o custo do material deste adsorvente é aproximadamente U\$1.720.

De posse da relação de adsorventes (ou suportes de afinidade) apresentada, o próximo passo foi realizar experimentos para responder se os mesmos apresentavam alta capacidade de retenção de IgE total e IgE's específicas e baixa capacidade de retenção de IgG, IgA e IgM, bem como de albumina humana.

#### 4.1.3. Capacidade de retenção dos suportes de afinidade

A capacidade de retenção dos suportes de afinidade Sepharose-con A, agarose-Lc, agarose-D-trp, agarose-PLL e agarose-Ah foi avaliada por meio de ensaios em frascos agitados, sendo o desempenho dos suportes em relação à retenção de IgE total e IgE's específicas, representado pela porcentagem de remoção de anticorpos (%R) (Eq. 1). O gel Sepharose (Seph) (sem ligante imobilizado) foi testado como suporte controle. Os resultados são apresentados na Figura 4.1, para o "pool" e o controle negativo A. Os

valores correspondentes aos gráficos da Figura 4.1 estão apresentados nas Tabelas 1A e 2A do Apêndice A.

A retenção de IgE's, total e específicas, foi possível para todos os adsorventes estudados, ocorrendo inclusive no suporte controle (Seph). Entretanto, os maiores valores de porcentagem de remoção foram obtidos para Sepharose-con A e agarose-Lc (variando de 37% a 79%). Nos ensaios com o "pool" (Figura 4.1a, 4.1c, 4.1d), os valores de %R para Sepharose-con A foram maiores ( $p \leq 0,05$ ) do que para Seph, agarose-D-trp, agarose-PLL e agarose-Ah. Nos ensaios com a amostra sérica controle negativo A (Figura 4.1b), os valores de %R para agarose-Lc foram maiores ( $p \leq 0,05$ ) do que para Seph, agarose-D-trp, agarose-PLL e agarose-Ah. Por outro lado, não se verificaram diferenças significativas entre Sepharose-con A e agarose-Lc. Estes resultados são concordantes com aqueles obtidos por SHIBASAKI e colaboradores (1992), que constataram afinidade alta entre as moléculas de IgE presentes em soro de pacientes atópicos e as lectinas con A e *Lens culinaris*. De acordo com esses autores, a IgE humana interage com essas lectinas através de receptores de carboidratos presentes na molécula de IgE.

Em relação às IgE's específicas, todos os suportes removeram IgE<sub>D1</sub> e IgE<sub>D201</sub>. Contudo, nenhum adsorvente estudado apresentou seletividade. O gel agarose-D-trp reteve quantidades maiores ( $p \leq 0,05$ ) dessas IgE's específicas quando comparadas à retenção de IgE total (Figuras 4.1a, 4.1c, 4.1d). Provavelmente este ligante possui maior afinidade pelas IgE's específicas do que pela IgE total.

Os resultados de %R de IgE total para Sepharose-con A e agarose-Lc (Figura 4.1a, 4.1b) foram maiores ( $p \leq 0,05$ ) nos ensaios com o "pool" do que nos ensaios com o soro controle negativo A. Isto pode ter ocorrido devido à diferença de concentração inicial de IgE total nas amostras séricas; de fato, o "pool" possui concentração de IgE total aproximadamente 8 vezes maior do que o soro controle negativo A (Tabela 3.2). Para verificar esta hipótese, seria necessário a execução de experimentos adicionais, empregando-se amostras séricas com diversas concentrações iniciais de IgE total e verificando se há correlação com a porcentagem de remoção.

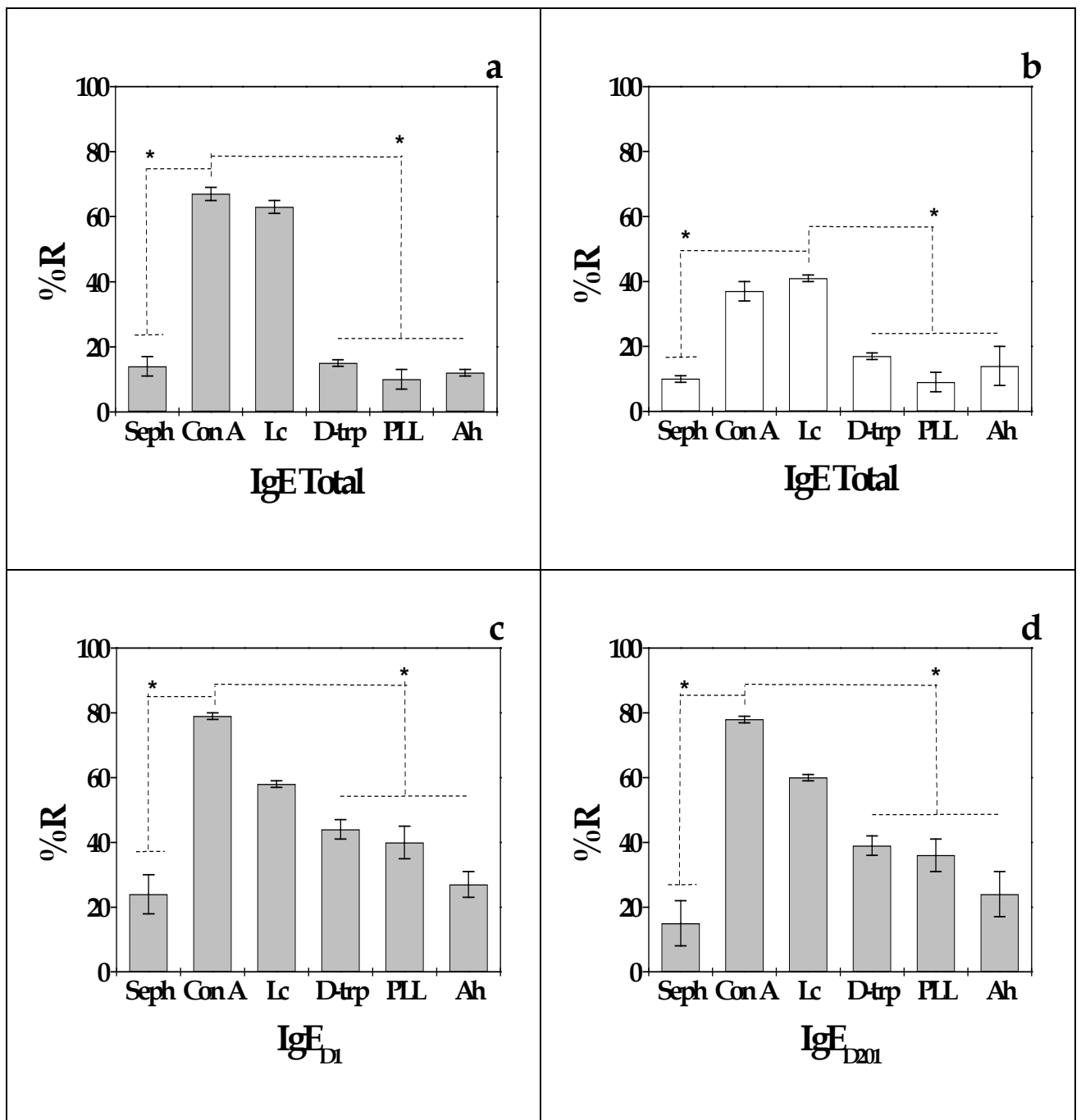


Figura 4.1: Porcentagens de remoção (%R) de IgE total (a,b), IgE<sub>D1</sub> (*Dermatophagoides pteronyssinus*) (c) e IgE<sub>D201</sub> (*Blomia tropicalis*) (d) obtidas nos experimentos realizados em frascos agitados empregando o “pool” (■) e o controle negativo A (□). Os valores representam a média ± desvio padrão de amostras em triplicata. \*p ≤ 0,05, comparando-se %R pelo teste Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica).

Segundo o quarto critério, os melhores adsorventes seriam Sepharose-con A e agarose-Lc, por apresentarem a maior capacidade de retenção de IgE total e IgE's específicas. Para verificar se a interação da con A e *Lens culinaris* com a molécula de IgE, era uma característica comum a todas lectinas ou se apenas à con A e *Lens culinaris*, buscou-se outro adsorvente com lectina imobilizada. Este adsorvente serviria como controle nos experimentos de adsorção. Escolheu-se a jacalina, uma lectina extraída de sementes de *Artocarpus integrifolia* (ROQUE-BARREIRA *et al.*, 1986; HAGIWARA *et al.*, 1988), que apresenta afinidade por D-galactose e N-acetil-galactosamina (KABIR, 1998) e, imobilizada em agarose, é utilizada na purificação de IgA<sub>1</sub> proveniente de secreções e de soro humano (GREGORY, RUNDEGREN, ARNOLD, 1987; LOOMES *et al.*, 1991). Assim, os mesmos experimentos de adsorção em frascos agitados (descritos no item 3.3.6), foram realizados com esta resina, utilizando-se o "pool" e o controle negativo A. Os valores de porcentagens de remoção de IgE total e IgE's específicas para a jacalina-agarose foram inferiores ao limite de detecção do método, mostrando que a afinidade por IgE não é uma característica comum a todas as lectinas.

#### 4.1.4. Seletividade dos suportes de afinidade

De acordo com o quinto critério, a remoção de IgA, IgG, IgM e albumina pelos suportes estudados foi também levada em consideração na seleção dos mesmos, uma vez que para aplicação em tratamento extracorpóreo, busca-se um suporte que não remova grandes quantidades dessas proteínas, a fim de se evitar a reposição das mesmas. Os resultados de porcentagens de remoção de imunoglobulinas e albumina obtidos nos experimentos com o "pool" e com os controles negativos A e B são apresentados na Figura 4.2 e na Tabela 4.1, respectivamente. Os valores correspondentes aos gráficos da Figura 4.2 estão apresentados na Tabela 3A do Apêndice A.

A retenção de IgA, IgG, IgM e albumina ocorreu em todos os suportes estudados, inclusive no suporte controle Sepharose, no qual as quantidades retidas foram na faixa de 20% a 30% (ensaios com o "pool") e de 11% a 19% (ensaios com os controles negativos A e B). O suporte Sepharose-con A reteve quantidades elevadas de IgA e IgM, cujos valores médios de %R foram 41% e 57%, respectivamente. Este suporte apresentou valor de %R de IgA (Figura 4.2a) estatisticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado aos valores para os géis agarose-D-triptofano e agarose-poli-L-lisina. A retenção de IgM no gel

Sepharose-con A (Figura 4.2c) foi estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparada àquela observada em Sepharose, agarose-D-triptofano, agarose-aminohexil e agarose-*Lens culinaris*, sendo aproximadamente 5 vezes maior do que o valor deste último suporte. Esta retenção expressiva de IgM em Sepharose-con A também foi constatada por RAY & RAYCHAUDHURI (1982), tanto para imunoglobulinas provenientes de mieloma, quanto para aquelas provenientes de soro sadio. Em relação à %R de albumina (Figura 4.2d), não se verificaram diferenças significativas entre os suportes estudados.

Os resultados dos experimentos com os soros controles negativos A e B (Tabela 4.1) foram similares entre si, indicando que a presença de IgE total (133 kU/L no CNA) não influenciou na retenção das outras imunoglobulinas (A, G e M).

Embora o gel agarose-*Lens culinaris* tenha retido quantidades consideráveis de IgA (valor médio de %R, 29%, Figura 4.2a e Tabela 4.1), ele pode ser considerado o suporte mais seletivo (quinto critério), uma vez que removeu predominantemente a molécula de interesse IgE (63% e 41% nos ensaios com “pool” e soro controle negativo A, respectivamente).

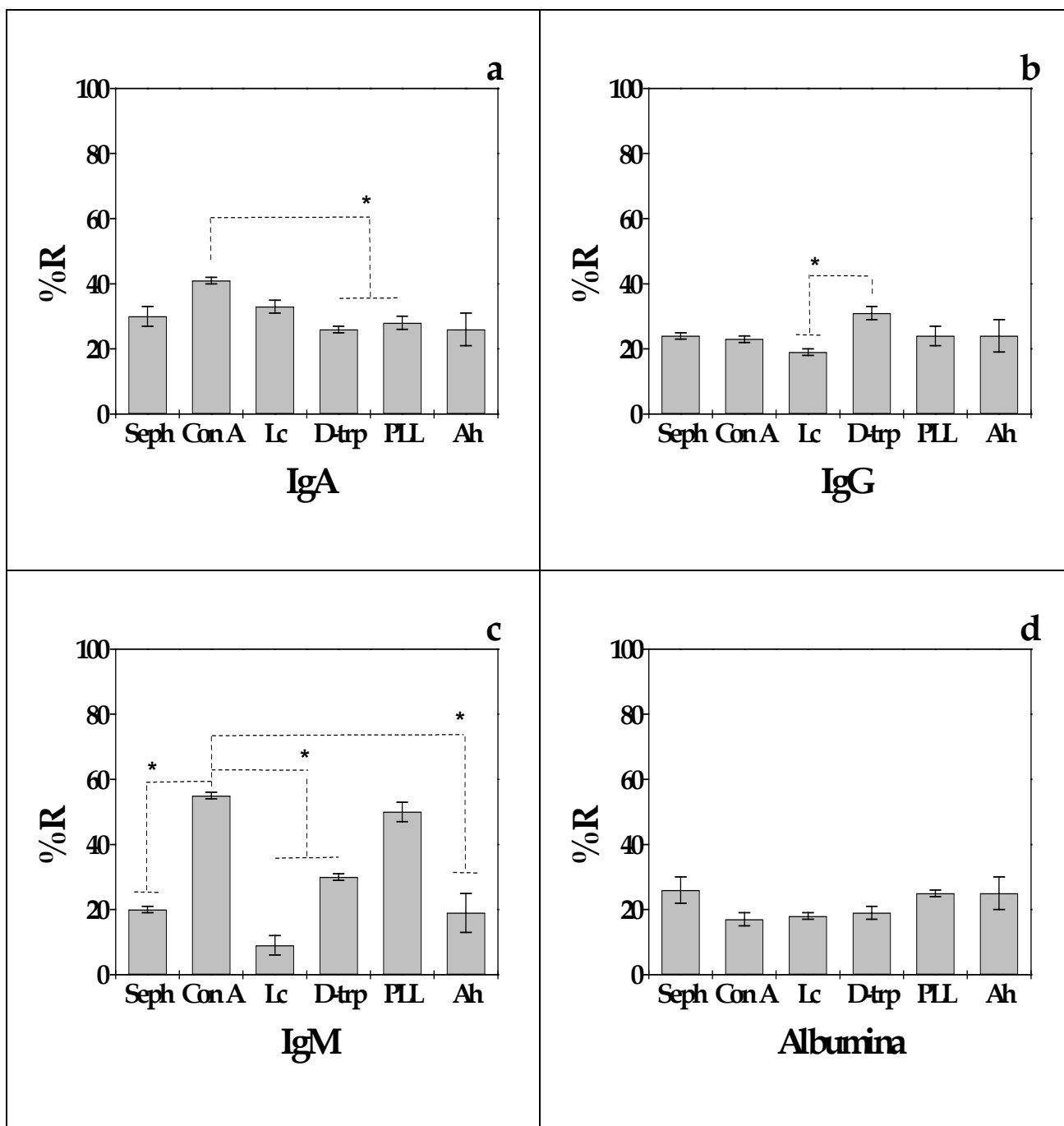


Figura 4.2: Porcentagens de remoção (%R) de IgA (a), IgG (b), IgM (c) e albumina (d) obtidas nos experimentos realizados em frascos agitados empregando-se o “pool”. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de amostras em triplicata. \* $p \leq 0,05$ , comparando-se %R pelo teste Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica).



Tabela 4.1: Porcentagens de remoção (%R) de IgA, IgG, IgM e albumina dos suportes estudados obtidas nos experimentos realizados em frascos agitados empregando-se os controles negativos A (CNA) e B (CNB). Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de amostras em triplicata.

Adsorventes	%R							
	IgA		IgG		IgM		Albumina	
	CNA	CNB	CNA	CNB	CNA	CNB	CNA	CNB
Sepharose	15 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2	19 $\pm$ 0	13 $\pm$ 1	11 $\pm$ 3	11 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	17 $\pm$ 2
Sepharose-con A	39 $\pm$ 2	42 $\pm$ 1	18 $\pm$ 0	16 $\pm$ 1	59 $\pm$ 2	62 $\pm$ 1	8 $\pm$ 2	13 $\pm$ 4
Agarose-Lc	26 $\pm$ 0	28 $\pm$ 1	17 $\pm$ 0	14 $\pm$ 0	11 $\pm$ 2	13 $\pm$ 1	11 $\pm$ 4	17 $\pm$ 3
Agarose-D-trp	18 $\pm$ 1	20 $\pm$ 1	33 $\pm$ 3	24 $\pm$ 1	28 $\pm$ 1	30 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2	19 $\pm$ 2
Agarose-PLL	22 $\pm$ 3	23 $\pm$ 0	25 $\pm$ 3	17 $\pm$ 1	65 $\pm$ 3	63 $\pm$ 2	13 $\pm$ 2	20 $\pm$ 2
Agarose-Ah	18 $\pm$ 3	16 $\pm$ 1	24 $\pm$ 5	15 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	19 $\pm$ 1

#### 4.1.5. Estudos de consumo de C3 e C4

A biocompatibilidade (sexto critério) é uma característica complexa que envolve vários aspectos, os quais podem ser analisados por meio de estudos de trombogenicidade, complemento, leucócitos mononucleares, citocinas, endotoxinas, reações de hipersensibilidade, amiloidoses, dentre outros (CHEUNG & LEMKE, 1994). Como o objetivo deste trabalho não foi abranger todos os aspectos da biocompatibilidade, escolheu-se a ativação do complemento como objeto de estudo. Neste trabalho, a medida da ativação do complemento foi realizada indiretamente por meio de estudos de consumo de C3 e C4. Ensaio com soro fresco foram realizados para verificar se o contato entre o soro e a superfície dos adsorventes induziria o consumo de C3 e C4 (Eq. 2), o que sugeriria ativação de complemento.

Dentre os suportes de afinidade estudados, Sepharose e agarose-*Lens culinaris* apresentaram os menores valores de porcentagem de consumo (%c) de C3 e C4, os quais não foram significativamente diferentes dos valores do soro controle ( $p > 0,05$ , Tabela 4.2), indicando que provavelmente não ocorreu ativação do complemento. Por outro lado, Sepharose-con A e agarose-poli-L-lisina mostraram os maiores valores de %c de C3 e C4,

os quais foram significativamente diferentes dos valores do soro controle ( $p \leq 0,05$ , Tabela 4.2), sugerindo ativação do complemento.

Tabela 4.2: Porcentagens de consumo (%c) de C3 e C4 para os suportes de afinidade estudados, obtidas de experimentos em batelada, empregando-se soro fresco\*.

Adsorventes	C3		C4	
	C <sub>sob</sub> (mg/dL)**	c%	C <sub>sob</sub> (mg/dL)**	c%
Soro controle	82,2	0,0	14,7	0,0
Sepharose	70,0	15	13,6	8,0
Sepharose-con A	18,0	78	4,90	67
Agarose-Lc	66,6	19	12,0	18
Agarose-D-trp	50,0	39	6,90	53
Agarose-PLL	32,9	60	2,05	86
Agarose-Ah	59,2	28	11,6	21

\* as concentrações iniciais de C3 e C4 presentes no soro fresco eram 83,7 mg/dL e 15,6 mg/dL, respectivamente (veja Tabela 3.2).

\*\* C<sub>sob</sub>: concentrações de C3 e C4 no sobrenadante (após incubação) de cada frasco agitado

Como resultado da seleção de adsorventes, o gel agarose-*Lens culinaris* foi selecionado dentre todos os suportes de afinidade estudados, como o mais promissor para utilização na terapia de adsorção seletiva de IgE através de circulação extracorpórea. Por outro lado, o gel Sepharose-con A apresentou bons resultados de capacidade de retenção de IgE, mas não atendeu ao critério de biocompatibilidade, importante para aplicação clínica. Este adsorvente foi selecionado para utilização em etapas intermediárias (obtenção de solução enriquecida em IgE) do processo de purificação de IgE. Portanto, as etapas subsequentes deste trabalho foram divididas em duas partes. A primeira (item 4.2) teve como objetivo o estudo do gel agarose-*Lens culinaris* visando aplicação na terapia de adsorção seletiva de IgE (circulação extracorpórea). A segunda parte (item 4.3) teve como finalidade o emprego do gel Sepharose-con A na preparação de soluções enriquecidas em IgE, como etapa intermediária do processo de purificação de IgE a partir de soluções séricas.

## 4.2. SIMULAÇÃO DA CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA PARA REMOÇÃO DE IgE: EMPREGO DO GEL AGAROSE-*LENS CULINARIS*

Os critérios investigados para a seleção de adsorventes foram avaliados por meio de experimentos de remoção de IgE em modo batelada, utilizando-se amostras séricas. Entretanto, na circulação extracorpórea o fluido a ser tratado é o plasma e a adsorção das proteínas ocorre em modo contínuo, no interior de colunas cromatográficas. Portanto, vários ensaios cromatográficos foram realizados para avaliar o desempenho do gel agarose-*Lens culinaris* em modo contínuo, em relação à adsorção de IgE total, específica e outros componentes do plasma (IgA, IgG, IgM e albumina). O suporte Sepharose sem ligante imobilizado também foi testado em relação à adsorção de IgE total, específica e daqueles componentes do plasma anteriormente citados. Inicialmente, fez-se uma cromatografia seguida de eletroforese SDS-PAGE e quantificações de IgE total, IgA, IgG, IgM e albumina (item 4.2.1). Em seguida, os efeitos de algumas variáveis operacionais na adsorção de IgE foram avaliados por meio de seis ensaios cromatográficos (item 4.2.2). Posteriormente, fizeram-se dois ensaios controles com Sepharose (item 4.2.3) e um ensaio usando o soro controle negativo C (item 4.2.4). Finalmente, um experimento foi realizado visando simular uma circulação extracorpórea (item 4.2.5), empregando as condições experimentais mais favoráveis à adsorção de IgE, selecionadas nos ensaios do item 4.2.2.

### 4.2.1. Capacidade de adsorção e seletividade do gel agarose-*Lens culinaris* em modo contínuo

Um experimento cromatográfico foi realizado com o objetivo de verificar quais proteínas eram adsorvidas no gel agarose-*Lens culinaris* em modo contínuo. A amostra plasma-K foi injetada em uma coluna contendo o referido gel e, as frações de lavagem e eluição foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE, sob condições desnaturantes e não redutoras (Figura 4.3).

O pico 1 representa as proteínas não adsorvidas (faixa 1) e provavelmente contém IgG, albumina e outras proteínas do plasma. Na faixa 2, correspondente ao pico de eluição da cromatografia com plasma-K, nota-se duas bandas bem definidas: uma superior a 212 kDa e outra próxima a 170 kDa. Esta última, representa provavelmente IgG (150 kDa) ou

IgA (170 kDa), enquanto que a primeira, aparenta ser fibrinogênio (340 kDa). Não foi possível detectar IgE (190 kDa) na faixa 2, possivelmente devido à sua baixa concentração ou então à formação de agregados.

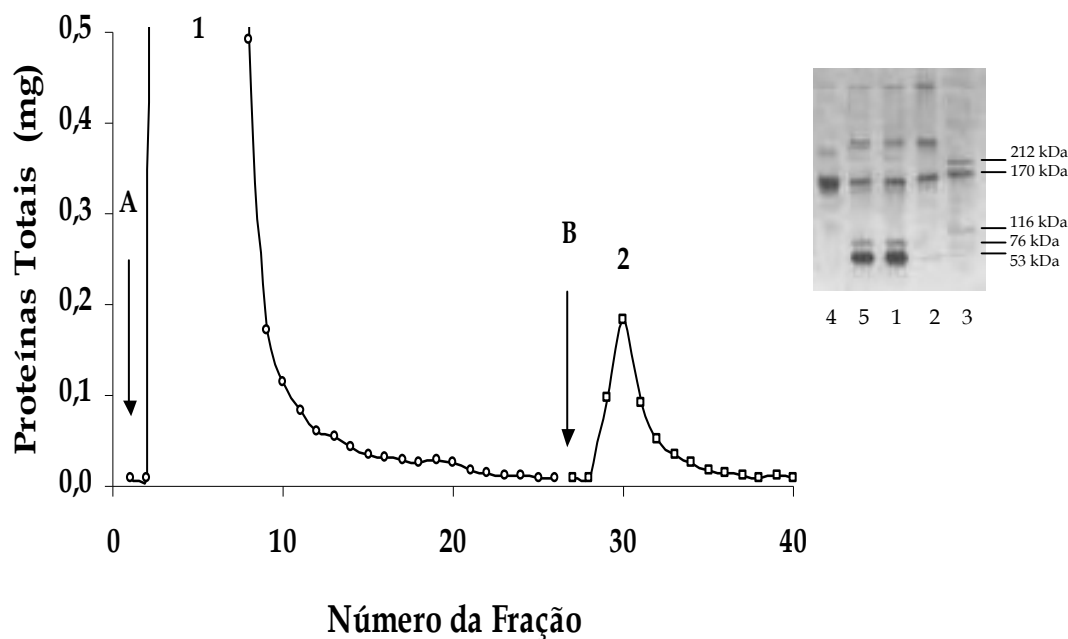


Figura 4.3: Perfil cromatográfico de plasma humano em agarose-*Lens culinaris*. Injeção de 4,56 mL de plasma-K. Tampão de adsorção, PBS 10 mM, pH 7,4 (○); tampão de dessorção, Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M, metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo 0,5 M, citrato de sódio 18 mM (□). Velocidade linear 0,78 cm/min; volume das frações, 1,0 mL; volume de leito, 1,6 mL. Os números 1 e 2 indicam os picos de proteínas obtidos. Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida gradiente 4 a 15%, sob condições desnaturantes e não-redutoras. Faixa: 4, IgG humana (Aventis Behring, Alemanha). Amostras de cromatografia. Faixas 5, plasma-K; 1, fração de lavagem; 2, fração de eluição. Faixa 3, Marcadores de massa molecular da Amersham Biosciences (miosina 212 kDa;  $\alpha$ -2-macroglobulina 170 kDa;  $\beta$ -galactosidase 116 kDa; transferrina 76 kDa e dehidrogenase glutâmica 53 kDa). As setas indicam o início das etapas de lavagem (A) e dessorção (B).

Estes resultados mostraram provável adsorção de fibrinogênio na matriz agarose-*Lens culinaris* (faixa 2, Figura 4.3). Segundo TERCERO & DIAZ-MAURINO (1988), a ligação não específica de fibrinogênio em Sepharose-*Lens culinaris* aglutinina é devido a uma forte interação entre as moléculas de fibrinogênio e os grupos ativos que permaneceram no gel após os processos de ativação por CNBr e imobilização do ligante.

Estes grupos ativos, principalmente imidocarbonatos e carbonatos, podem ser inativados por meio de tratamento com HCl e etanolamina; entretanto, alguns grupos permanecem ativos mesmo após este tratamento.

Para tentar identificar as proteínas possivelmente relacionadas à banda próxima a 170 kDa (faixa 2, Figura 4.3), as frações de injeção, lavagem e eluição da cromatografia foram analisadas por nefelometria e FEIA, para dosagem de IgA, IgG, IgM, albumina e IgE total, respectivamente. Verificou-se a presença de IgA e IgG na fração de eluição, da ordem de 0,1 mg (Tabela 4.3), o que contribui para a hipótese de que, provavelmente, a banda próxima a 170 kDa (faixa 2, Figura 4.3) represente IgA e IgG adsorvidas na resina agarose-*Lens culinaris*. Em relação à IgE total, tanto a fração de lavagem quanto a de eluição continham esta imunoglobulina (0,298 kU e 0,107 kU, respectivamente, Tabela 4.3), apesar de não ter sido identificada na eletroforese. Além disso, a porcentagem de IgE total eluída (27,9%) é expressivamente maior do que as porcentagens das outras imunoglobulinas eluídas (IgA, 2,9%, IgG, 0,4% e IgM, 0,9%), resultados estes condizentes com os obtidos nos experimentos em frascos agitados para o gel agarose-*Lens culinaris* (ver Figuras 4.1 e 4.2).

O próximo passo foi investigar o efeito de algumas variáveis operacionais na adsorção de IgE, visando selecionar as melhores condições experimentais para posteriormente simular *in vitro* a circulação extracorpórea.

Tabela 4.3: Balanço de massa para IgA, IgG, IgM, albumina e IgE total resultante das análises de nefelometria e FEIA do plasma-K e das frações de lavagem e eluição da cromatografia em gel agarose-*Lens culinaris*.\*

Etapa	IgA		IgG		IgM		Albumina		IgE total	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	kU	%
Injeção	4,53	100	46,64	100	7,88	100	165	100	0,383	100
Lavagem	4,20	92,7	48,22	103,4	8,13	103,2	173	104,8	0,298	77,8
Eluição	0,13	2,9	0,19	0,4	0,07	0,9	ND	ND	0,107	27,9
Recuperação	4,33	95,6	48,41	103,8	8,20	104,1	173	104,8	0,405	105,7

\* coluna cromatográfica B (10 cm x 10 mm I.D.).

ND: valores não detectáveis (abaixo do limite de detecção do método).

#### 4.2.2. Efeito de variáveis operacionais na adsorção de IgE

As influências da velocidade superficial ( $v$ , cm/min), do número de passagens de plasma pela coluna (npp), da razão entre volume de plasma e volume de leite ( $v_p/v_l$ ) e da temperatura ( $T$ ), na capacidade de adsorver IgE, IgA, IgG, IgM e albumina no suporte agarose-*Lens culinaris* foram avaliadas para determinar as condições experimentais mais favoráveis à adsorção de IgE.

A adsorção das imunoglobulinas não foi influenciada pela velocidade superficial (Tabela 4.4, ensaios 1 e 2), na faixa de 0,26 a 0,78 cm/min (equivalente a 0,05 a 0,15 mL/min). Optou-se por utilizar a velocidade superficial de 0,78 cm/min nos experimentos subsequentes, uma vez que quanto maior o valor da velocidade superficial, menor o tempo gasto na circulação extracorpórea e menos desconforto há para o paciente.

Considerando-se procedimentos clínicos de circulação extracorpórea, a variável operacional npp está relacionada ao tempo gasto na sessão de circulação extracorpórea. Em procedimentos *in vitro*, essa variável indica quantas vezes o plasma passa pela coluna (circulação). Comparando-se os resultados de %A para uma passagem de plasma e duas passagens de plasma (Tabela 4.4, ensaios 2 e 3), nota-se que não houve diferença efetiva na adsorção das imunoglobulinas. Entretanto, quando se passou o plasma-K três vezes pela coluna (Tabela 4.4, ensaio 4), os valores de %A para IgE total e IgE<sub>D1</sub> diminuíram expressivamente. Neste caso, provavelmente ocorreu dessorção de proteínas devido ao deslocamento de equilíbrio, pois a concentração de proteínas no reservatório variou à medida que o plasma circulou pela coluna. Ao término da primeira passagem de plasma pela coluna, como uma certa quantidade de IgE tinha sido adsorvida, a concentração de IgE na solução do reservatório diminuiu. Com a diminuição desta concentração, a quantidade a ser adsorvida também diminuiu. Essa dessorção de proteínas decorrente de circulação de plasma pela coluna, também foi verificada em outros sistemas de afinidade (AVENHAUS *et al.*, 2002). Em relação a IgA, IgG, IgM e albumina, verifica-se que o tempo de circulação não influenciou nas porcentagens de adsorção. A concentração destas proteínas no plasma é elevada quando comparada a de IgE. Como a matriz de afinidade adsorve pouca quantidade de IgA, IgG, IgM e albumina, não há diminuição significativa de concentração no reservatório, permanecendo praticamente constante. Nos experimentos subsequentes, manteve-se o valor de npp igual a uma passagem de plasma pela coluna.

Tabela 4.4: Porcentagens de adsorção (%A) de IgE total, IgE<sub>D1</sub>, IgA, IgG, IgM e albumina à agarose-*Lens culinaris* em função de seis condições experimentais.

Ensaio	Variáveis operacionais *				%A					
	v (cm/min)	npp	vp/vl	T(°C)	IgE total	IgE <sub>D1</sub>	IgA	IgG	IgM	albumina
1	0,26	1	5,70	25	26,2	9,0	1,9	0,3	0,6	ND
2	0,78	1	5,70	25	23,6	7,5	1,3	0,2	0,3	ND
3	0,78	2	5,70	25	24,6	5,6	1,3	0,2	0,6	ND
4	0,78	3	5,70	25	9,4	1,7	1,1	0,2	0,5	ND
<b>5</b>	<b>0,78</b>	<b>1</b>	<b>2,85</b>	<b>25</b>	<b>28,7</b>	<b>14,5</b>	<b>2,1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	ND
6	0,78	1	2,85	37	22,0	8,4	1,2	0,1	0,3	ND

\* v: velocidade superficial; npp: número de passagens de plasma pela coluna; vp/vl: razão entre volume de plasma e volume de leite; T: temperatura.

ND: valores não detectáveis (abaixo do limite de detecção do método).

A razão entre volume de plasma e volume de leite indica qual o volume total de plasma que poderia ser processado em um determinado sistema de adsorção, podendo ser estimado a partir da capacidade máxima de adsorção do gel ( $Q_m$ , mg/mL gel). Como este parâmetro para o sistema agarose-*Lens culinaris*-IgE não está disponível, escolheu-se os valores para vp/vl iguais a 5,7 (usado em aferese clínica para remoção de autoanticorpos empregando ligantes pseudobiospecíficos, AVENHAUS *et al.*, 2002) e 2,85. Como mostrado nos ensaios 2 e 5 (Tabela 4.4), ao se diminuir vp/vl de 5,7 para 2,85, houve aumento das porcentagens de adsorção de 23,6% para 28,7% (IgE total) e de 7,5% para 14,5% (IgE<sub>D1</sub>). Provavelmente, a vp/vl igual a 5,7, a coluna estava saturada em relação às IgE's. Em relação a IgA, IgG e IgM, a variação de vp/vl não influenciou expressivamente na adsorção das mesmas. O valor de vp/vl igual a 2,85 foi mantido no experimento subsequente.

A influência da temperatura na adsorção de IgE também foi analisada, uma vez que o procedimento clínico de circulação extracorpórea é realizado a aproximadamente 37 °C. As porcentagens de adsorção diminuíram de 28,7% para 22,0% (IgE total) e de 14,5% para 8,4% (IgE<sub>D1</sub>) com o aumento da temperatura de 25 °C para 37 °C (Tabela 4.4, ensaios 5 e 6). A variação de T não influenciou nos valores de %A de IgA, IgG e IgM.

Conclui-se que dentre as condições experimentais testadas, as mais favoráveis à adsorção de IgE foram aquelas usadas no ensaio 5 (Tabela 4.4), ou seja,  $v$ , 0,78 cm/min, npp, 1, vp/vl, 2,85 e T, 25 °C.

#### 4.2.3. Estudo de adsorção não específica entre IgE e Sepharose CL-4B

Estes ensaios foram conduzidos como controle para verificar se havia interação entre IgE e o gel Sepharose CL-4B, uma vez que nos ensaios de remoção em frascos agitados (item 4.1.3), quantidades significativas de IgE's total e específicas ( $10 < \%R < 24\%$ , Figura 4.1) ficaram retidas neste suporte.

Dois experimentos foram realizados nas mesmas condições experimentais do ensaio 2 (descrito na Tabela 3.3), injetando-se na coluna empacotada com Sepharose ora o plasma-K, ora o controle negativo C. No primeiro experimento (plasma-K), a quantidade de IgE total adsorvida em Sepharose foi inexpressiva ( $\%A$ , 0,8%), quando comparada aos valores obtidos para agarose-*Lens culinaris*, nas mesmas condições experimentais (Tabela 4.4, ensaio 2,  $\%A$ , 23,6%). Além disso, as quantidades de IgE<sub>DL</sub>, IgA, IgG, IgM e albumina presentes nas frações eluídas da coluna Sepharose não foram detectadas pelos métodos de FEIA (UniCAP 100) e nefelometria (Array Protein System 360). Portanto, apenas o ligante *Lens culinaris* é o responsável pela adsorção dos componentes do plasma. A comparação desses resultados ( $\%A$ ) com aqueles obtidos nos ensaios em batelada ( $\%R$ ) para a Sepharose (Figuras 4.1 e 4.2 e Tabela 4.1) indica que nos ensaios em frascos agitados, grande parte das proteínas não foi realmente adsorvida no suporte Sepharose. Provavelmente, estas proteínas permaneceram nos espaços intersticiais das partículas do suporte durante a incubação, ou foram adsorvidas por interações muito fracas não-específicas. No segundo experimento (controle negativo C), as quantidades de IgA, IgG, IgM e albumina presentes nas frações eluídas da coluna Sepharose não foram detectadas pelos métodos de FEIA (UniCAP 100) e nefelometria (Array Protein System 360), concordando com os resultados do experimento com plasma-K (primeiro experimento).

#### 4.2.4 Influência de IgE total na adsorção das outras imunoglobulinas

Para verificar se a presença de IgE total influencia na adsorção das outras imunoglobulinas, realizou-se um experimento no qual o controle negativo C foi injetado



na coluna agarose-*Lens culinaris* nas mesmas condições experimentais do ensaio 2 (Tabela 3.3). Os resultados de %A (IgA, 1,3%, IgG, 0,2% e IgM, 0,4%) foram similares àqueles obtidos com plasma-K no ensaio 2 (Tabela 4.4), ou seja, a presença de IgE total não influencia na adsorção das imunoglobulinas A, G e M. Este resultado confirma o obtido nos experimentos em frascos agitados (ver Tabela 4.1). Avaliando-se esses resultados, pode-se inferir que a presença das outras imunoglobulinas também não influenciam na adsorção de IgE.

#### 4.2.5. Simulação *in vitro* de circulação extracorpórea para remoção de IgE

O desempenho do gel agarose-*Lens culinaris* em condições similares às usadas clinicamente foi avaliado por meio da porcentagem de remoção de imunoglobulinas e albumina (%R, Eq. 1). Os valores das variáveis operacionais previamente selecionados foram mantidos constantes ( $v$ , 0,78 cm/min; npp, 1 passagem de plasma;  $vp/vl$ , 2,85;  $T$ , 25 °C) e os ensaios foram realizados em duplicata, como descrito no item 3.3.8.2.

A matriz de afinidade agarose-*Lens culinaris* removeu parcialmente as imunoglobulinas analisadas e albumina. As porcentagens de remoção das moléculas alvo IgE total ( $40,7\% \pm 11,5$ ), IgE<sub>D1</sub> ( $40,9\% \pm 1,5$ ) e IgE<sub>D201</sub> ( $42,8\% \pm 2,0$ ) foram maiores do que para IgA ( $25,9\% \pm 0,8$ ), IgG ( $22,2\% \pm 6,2$ ), IgM ( $10,3\% \pm 2,3$ ) e albumina ( $20,9\% \pm 5,0$ ). Além disso, esses resultados estão concordantes com aqueles obtidos nos ensaios em batelada para o controle negativo A (Figura 4.1b e Tabela 4.1), exceto para albumina, cujo valor (%R, 20,9%) foi aproximadamente o dobro do obtido nos experimentos em batelada. Cabe ressaltar que essa comparação deve ser feita apenas entre amostras que possuam concentrações iniciais de imunoglobulinas na mesma ordem de grandeza, o que é observado entre o controle negativo A e o plasma-K (veja Tabela 3.2).

O desempenho do gel agarose-*Lens culinaris* foi insatisfatório quando comparado ao do gel Sepharose-CL-4B-anti-IgE, cuja remoção de IgE do plasma de cinco pacientes atópicos alcançou a faixa de 83 a 98% (LEBEDIN *et al.*, 1991). Esse resultado pode estar relacionado às baixas concentrações de IgE presentes na amostra de plasma-K. Nos ensaios em batelada (seleção de adsorventes), a amostra empregada (“pool”) continha concentração aproximadamente 8 vezes superior ao plasma-K. Experimentos a partir de amostras plasmáticas com concentração mais elevada de IgE, poderiam ser realizados para

se avaliar melhor o desempenho do gel agarose-*Lens culinaris*, uma vez que ele apresenta custos mais atrativos e maior facilidade de obtenção do que Sepharose-CL-4B-anti IgE.

#### 4.3. APLICAÇÃO DO GEL SEPHAROSE-CON A NA OBTENÇÃO DE SOLUÇÕES ENRIQUECIDAS EM IgE

Os resultados da seleção de adsorventes (item 4.1) mostraram o potencial de utilização do gel Sepharose-con A em etapas intermediárias do processo de purificação de IgE, por meio de enriquecimento de soluções séricas, uma vez que o referido adsorvente, reteve grandes quantidades de IgE total nos ensaios com “pool” (%R, 67%, Figura 4.1a) e com o controle negativo A (%R, 37%, Figura 4.1b). Entretanto, verificou-se a retenção de outras imunoglobulinas em quantidades significativas, principalmente IgA e IgM, tornando necessário o uso de outras etapas cromatográficas para separar, em eventual processo de purificação de IgE, estas imunoglobulinas da solução enriquecida em IgE. A estratégia desenvolvida neste trabalho foi a execução de duas etapas cromatográficas, explorando princípios de afinidade (primeira etapa) e exclusão por tamanho (segunda etapa). Inicialmente, realizaram-se dois experimentos preliminares (itens 4.3.1 e 4.3.2), nos quais a amostra sérica inicial continha concentrações moderadas de IgE total (soro-K). A partir desses resultados, modificou-se parte da metodologia a fim de se melhorar o resultado final e empregou-se uma amostra sérica inicial contendo concentrações altas de IgE total (soro-G, itens 4.3.3 e 4.3.4). Para finalizar, a imunoglobulina do isotipo E, presente na solução final enriquecida em IgE, foi identificada por meio de “immunoblotting”.

##### 4.3.1. Cromatografia de afinidade para obtenção de solução enriquecida em IgE a partir do soro-K - ensaio preliminar

Nesta etapa, as colunas de afinidade agarose-jacalina e Sepharose-con A foram montadas em série e alimentadas com soro-K (amostra sérica contendo concentrações moderadas de IgE total). A coluna Sepharose-con A adsorveu predominantemente IgE e IgM (adsorveu pequena quantidade de IgG, IgA e albumina, Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Balanço de massa para IgA, IgG, IgM, albumina e IgE total resultante da cromatografia com as colunas agarose-jacalina e Sepharose-con A em série, a partir do soro-K\*.

Etapas**	IgE total		IgA		IgG		IgM		Albumina	
	kU	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Injeção (soro-K)	0,54	100	1,91	100	33,92	100	2,81	100	101,45	100
Lavagem	0,03	5,6	ND	ND	29,35	86,5	0,26	9,4	95	93,6
Eluição jac	ND	ND	1,15	60,2	ND	ND	ND	ND	0,03	0,03
Eluição con A	0,45	83,3	0,35	18,3	0,54	1,6	2,02	71,9	0,14	0,1
Recuperação***	0,48	88,9	1,50	78,5	29,89	88,1	2,28	81,3	95,2	93,8

\* volume de leite, 3,0 mL; volume de injeção, 3,0 mL

\*\* Eluição jac: eluição da coluna agarose-jacalina; Eluição con A: eluição da coluna Sepharose-con A

\*\*\* os resultados do balanço de massa não alcançaram 100%, possivelmente devido à precipitação de proteínas ocorrida na fração de lavagem

ND: valores não detectáveis (abaixo do limite de detecção do método).

O gel agarose-jacalina adsorveu apenas 60,2% da quantidade de IgA injetada (Tabela 4.5). Este fato permitiu a passagem direta de parte desta imunoglobulina e conseqüentemente sua adsorção na coluna de Sepharose-con A. Isso não afetou significativamente no enriquecimento da solução em IgE, uma vez que o gel Sepharose-con A adsorveu grandes quantidades de IgE total (83,3%) e de IgM (71,9%).

As frações de eluição da coluna Sepharose-con A foram agrupadas, dialisadas contra 4,0 L de PBS 0,1 M, pH 7,4 (para remoção de metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo) e concentradas por evaporação (o volume foi reduzido 6,7 vezes). Após a evaporação verificou-se formação de cristais que se aderiram às paredes dos tubos de polipropileno, indicando que, ou a diálise não foi suficiente para remover todo o metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo, ou parte das proteínas se cristalizou. Estes cristais foram analisados em microscópio ótico com aumento de 100X. Para verificar se estes cristais eram constituídos de proteína ou de sais inorgânicos, eles foram corados com IZIT Cristal Dye (Hampton Research, EUA). A pouca intensidade da coloração sugere ausência de proteínas (Figura 4.4). Os cristais foram retirados da solução, a qual foi denominada solução enriquecida em IgE e quantificada em relação a IgE total, IgA, IgG, IgM e albumina (Tabela 4.6) para

cálculo da porcentagem de recuperação ( $\%Recup_{IgE}$ ) e do fator de enriquecimento em IgE em relação aos isotipos IgA, IgG, IgM e à albumina (FE). Constatou-se perda de 26% de IgE após as etapas de diálise e evaporação. Como resultado da etapa de afinidade, obteve-se  $\%Recup_{IgE}$  de IgE total igual a 57,3% e FE igual a 26,3. Note-se que,  $IgE_{Relat}$  da solução enriquecida em IgE ( $2,83 \times 10^{-2}\%$ , Tabela 4.6) e da injeção ( $1,08 \times 10^{-3}\%$ , Tabela 4.6) são iguais a  $E_{Relat}$  (Eq. 6) e  $I_{Relat}$  (Eq. 7), respectivamente, usados para calcular FE. Os cálculos são detalhados no Apêndice A.



Figura 4.4: Cristais formados após evaporação das frações de eluição da coluna Sepharose-con A, cromatografia a partir do soro-K. Aumento de 100X. Os cristais foram corados com IZIT Cristal Dye.

Tabela 4.6: Quantidade de imunoglobulinas, albumina e  $IgE_{Relat}^1$  presentes nas amostras de injeção e solução enriquecida em IgE (após diálise e evaporação), obtidas da cromatografia com as colunas agarose-jacalina e Sepharose-con A em série, a partir do soro-K.

Amostras	Quantidade (mg)					$IgE_{Relat}$ (%)
	$IgE$ total <sup>4</sup>	IgA	IgG	IgM	Albumina	
Injeção <sup>2</sup> (soro-K)	$1,51 \times 10^{-3}$	1,91	33,92	2,81	101,45	$1,08 \times 10^{-3}$
Solução enriquecida em $IgE^3$	$8,64 \times 10^{-4}$	0,35	0,54	2,02	0,14	$2,83 \times 10^{-2}$

<sup>1</sup>  $IgE_{Relat}$  = porcentagem em massa de IgE total em relação a IgA, IgG, IgM e albumina (Eq. 6 e Eq. 7)

<sup>2</sup> volume de injeção, 3,0 mL

<sup>3</sup> volume da solução enriquecida em IgE, 3,3 mL

<sup>4</sup> 1 kU (unidade de anticorpo) equivale a  $2,8 \times 10^{-3}$  mg

#### 4.3.2. Cromatografia de permeação em gel para obtenção da solução final enriquecida em IgE - ensaio preliminar

A solução enriquecida em IgE obtida na etapa de cromatografia por afinidade (a partir do soro-K) foi injetada na coluna Protein Pak 300 sw, obtendo-se três picos A, B e C (Figura 4.5), com tempos de retenção iguais a 10,4 min, 15,6 min e 21,7 min. O perfil do pico B sugere a presença de pelo menos dois tipos de proteínas. Portanto, na coleta das frações o pico B foi dividido em duas partes denominadas fração B1 e fração B2.

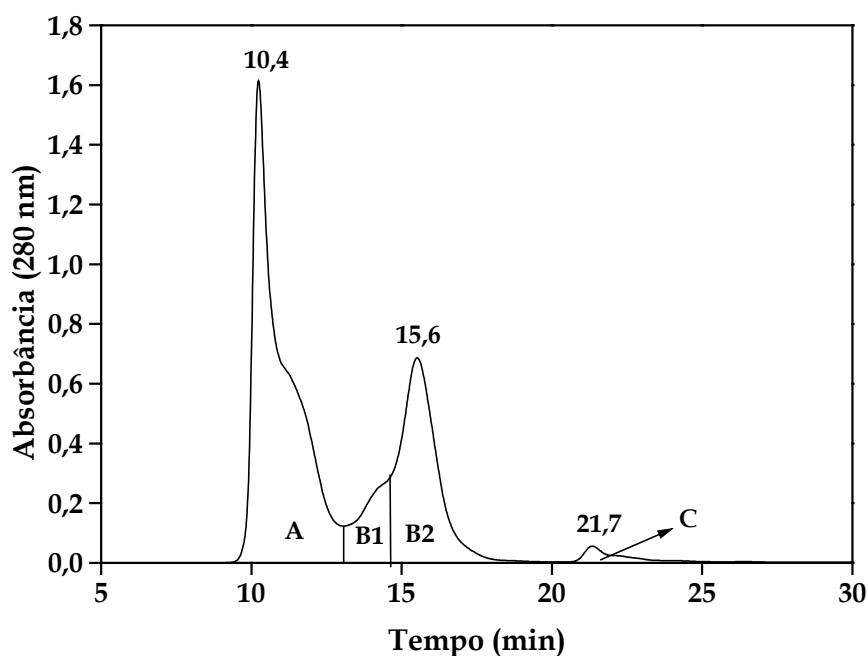


Figura 4.5: Cromatografia de permeação em gel de alto desempenho na coluna Protein Pak 300 sw; fase móvel tampão PBS 0,1 M pH 7,4, vazão 0,5 mL/min, injeções de 200  $\mu$ L, 25  $^{\circ}$ C.

As quantidades de imunoglobulinas e albumina detectadas na amostra de injeção, nos picos e frações são mostradas na Tabela 4.7. A molécula com maior massa molecular - IgM (900 kDa) - foi a primeira a ser eluída da coluna (pico A). Em seguida, eluiu-se IgE (190 kDa) e IgG (150 kDa) juntamente com pequenas quantidades de IgM (fração B1). As imunoglobulinas E e G continuaram a ser eluídas da coluna (fração B2), não sendo possível separá-las umas das outras. IgA (170 kDa) e albumina (66 kDa) não foram detectadas (por nefelometria) em nenhum pico, provavelmente devido à baixa concentração. Na fração B2, verificou-se menor quantidade de IgE total do que na fração

B1, mas dentre as proteínas quantificadas, detectou-se apenas IgG e IgE. Assim, considerou-se a fração B2 como a solução final enriquecida em IgE e baseou-se no seu teor de IgE total e IgG para calcular a %Recup<sub>IgE</sub> e o FE. Como resultado, obteve-se porcentagem de recuperação de IgE total (%Recup<sub>IgE</sub>) igual a 79,1% e fator de enriquecimento em IgE em relação aos isotipos IgA, IgG, IgM e à albumina (FE) igual a 12,6. Os cálculos são detalhados no Apêndice A.

Tabela 4.7: Quantidade de imunoglobulinas, albumina e IgE<sub>Relat</sub>\* presentes nas amostras de injeção, picos e frações obtidos na cromatografia de permeação em gel (ensaio preliminar).

Amostras	Quantidade (mg)					IgE <sub>Relat</sub> (%)
	IgM	IgE total***	IgA	IgG	Albumina	
Injeção**	0,12	$5,2 \times 10^{-5}$	$1,98 \times 10^{-2}$	$3,7 \times 10^{-2}$	$8,8 \times 10^{-3}$	0,028
pico A	$7,0 \times 10^{-2}$	ND	ND	ND	ND	ND
fração B1	$6,0 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-5}$	ND	$1,0 \times 10^{-2}$	ND	0,309
<b>fração B2</b>	ND	<b><math>4,1 \times 10^{-5}</math></b>	ND	<b><math>1,2 \times 10^{-2}</math></b>	ND	0,353
pico C	ND	ND	ND	ND	ND	ND

\* IgE<sub>Relat</sub> = porcentagem em massa de IgE total em relação a IgA, IgG, IgM e albumina (Eq. 6 e Eq. 7)

\*\* volume de injeção, 200 µL.

\*\*\* 1 kU (unidade de anticorpo) equivale a  $2,8 \times 10^{-3}$  mg.

ND: valores não detectáveis (abaixo do limite de detecção do método).

#### 4.3.3. Cromatografia de afinidade para obtenção de solução enriquecida em IgE a partir do soro-G

Este experimento foi realizado nas mesmas condições do item 4.3.1, diferindo apenas na amostra sérica injetada - soro-G - que continha concentrações elevadas de IgE total.

Como observado no experimento preliminar (item 4.3.1), todas as imunoglobulinas estudadas e a albumina foram adsorvidas em Sepharose-con A, predominantemente IgE e IgM (Tabela 4.8). Entretanto, a quantidade de IgE adsorvida (tanto em kU quanto em %) foi maior do que no ensaio preliminar; isso se deve provavelmente à maior concentração de IgE no soro-G (5,8 vezes maior do que no soro-K).

Tabela 4.8: Balanço de massa para IgA, IgG, IgM, albumina e IgE total resultante da cromatografia com as colunas agarose-jacalina e Sepharose-con A em série, a partir do soro-G\*.

Etapas**	IgE total		IgA		IgG		IgM		Albumina	
	kU	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Injeção (soro-G)	3,14	100	14,67	100	48,00	100	3,42	100	102,3	100
Lavagem	0,52	16,5	3,43	23,4	41,17	85,8	0,43	12,6	109,9	107,5
Eluição jac	ND	ND	4,57	31,1	0,30	0,6	ND	ND	0,84	0,80
Eluição con A	3,10	98,7	2,15	14,6	0,94	2,0	2,20	64,3	0,09	0,10
Recuperação***	3,62	115	10,14	69,2	42,41	88,4	2,63	76,9	110,9	108,4

\* volume de leite, 3,0 mL; volume de injeção, 3,0 mL

\*\* Eluição jac: eluição da coluna agarose-jacalina; Eluição con A: eluição da coluna Sepharose-con A

\*\*\* os resultados do balanço de massa não alcançaram 100%, possivelmente devido à precipitação de proteínas ocorrida na fração de lavagem.

ND: valores não detectáveis (abaixo do limite de detecção do método).

Apesar da coluna agarose-jacalina ter adsorvido maior quantidade de IgA no ensaio com soro-G (4,57 mg, Tabela 4.8) do que no experimento com soro-K (1,15 mg, Tabela 4.5), aquela massa representou apenas 31,1% do total injetado no sistema, pois o soro-G apresentava alto teor de IgA (14,67 mg). Esse fato resultou na saturação da coluna em IgA, na passagem direta de parte desta imunoglobulina e conseqüentemente em sua adsorção na coluna Sepharose-con A. Isso pode ter contribuído para um fator de enriquecimento em IgE em relação aos isotipos IgA, IgG, IgM e à albumina (FE) menor do que o obtido no experimento preliminar.

As frações de eluição da coluna Sepharose-con A foram agrupadas, dialisadas contra 5,0 L de PBS 0,1 M, pH 7,4 e concentradas por evaporação. O volume foi reduzido 25 vezes (fator maior do que o alcançado no experimento preliminar), buscando-se obter concentrações mais altas de todas as proteínas, possibilitando a detecção das mesmas após a separação por HPGPC. Como observado anteriormente, após a evaporação verificou-se formação de cristais, os quais foram analisados em microscópio ótico com aumento de 100X. Para verificar se estes cristais eram constituídos de proteína ou de sais inorgânicos, eles foram corados com IZIT Cristal Dye (Hampton Research, EUA) (Figura 4.6).

Comparando-se estes cristais com aqueles da Figura 4.4, nota-se que estes apresentam coloração mais intensa, sugerindo formação de cristais de parte das proteínas. Os cristais foram retirados da solução, a qual foi denominada solução enriquecida em IgE e quantificada em relação a IgE, IgA, IgG, IgM e albumina (Tabela 4.9) para cálculo da porcentagem de recuperação (%Recup<sub>IgE</sub>) e do fator de enriquecimento em IgE em relação aos isotipos IgA, IgG, IgM e à albumina (FE). Constatou-se a perda de 53,2% de IgE após as etapas de diálise e evaporação. Como resultado da etapa de afinidade, obteve-se %Recup<sub>IgE</sub> de IgE total igual a 45,5% e FE igual a 22,3. Os cálculos são detalhados no Apêndice A.

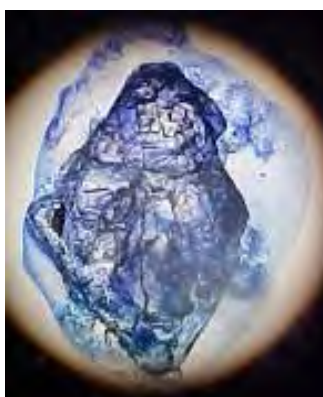


Figura 4.6: Cristais formados após evaporação das frações de eluição da coluna Sepharose-con A, cromatografia a partir do soro-G. Aumento de 100X. Os cristais foram corados com IZIT Cristal Dye.

Tabela 4.9: Quantidade de imunoglobulinas, albumina e IgE<sub>Relat</sub><sup>1</sup> presentes nas amostras de injeção e solução enriquecida em IgE (após diálise e evaporação), obtidas da cromatografia com as colunas agarose-jacalina e Sepharose-con A em série, a partir do soro-G.

Amostras	Quantidade (mg)					IgE <sub>Relat</sub> (%)
	IgE total <sup>4</sup>	IgA	IgG	IgM	Albumina	
Injeção <sup>2</sup> (soro-G)	$8,79 \times 10^{-3}$	14,67	48,00	3,42	102,3	$5,22 \times 10^{-3}$
Solução enriquecida em IgE <sup>3</sup>	$4,00 \times 10^{-3}$	1,145	0,814	1,385	0,09	0,116

<sup>1</sup> IgE<sub>Relat</sub> = porcentagem em massa de IgE total em relação a IgA, IgG, IgM e albumina (Eq. 6 e Eq. 7)

<sup>2</sup> volume de injeção, 3,0 mL

<sup>3</sup> volume da solução enriquecida em IgE, 2,43 mL

<sup>4</sup> 1 kU (unidade de anticorpo) equivale a  $2,8 \times 10^{-3}$  mg



#### 4.3.4. Cromatografia de permeação em gel para obtenção da solução final enriquecida em IgE

Este experimento foi realizado nas mesmas condições do item 4.3.2, diferindo apenas na vazão da fase móvel: 0,25 mL/min. Este valor foi utilizado a fim de se melhorar a separação dos picos. A solução enriquecida em IgE obtida na etapa de cromatografia por afinidade (a partir do soro-G) foi injetada na coluna Protein Pak 300 sw, à vazão de 0,25 mL/min, obtendo-se cinco picos D, E, F, G e H, com tempos de retenção iguais a 20,5 min, 28,9 min, 31,6 min, 42,9 min e 46,7 min, respectivamente (Figura 4.7). Os perfis dos picos D e E sugerem a presença de pelo menos dois tipos de proteínas em cada um deles. Portanto, na coleta das frações cada um desses picos foi dividido em duas partes, denominadas fração D1, fração D2, fração E1 e fração E2.

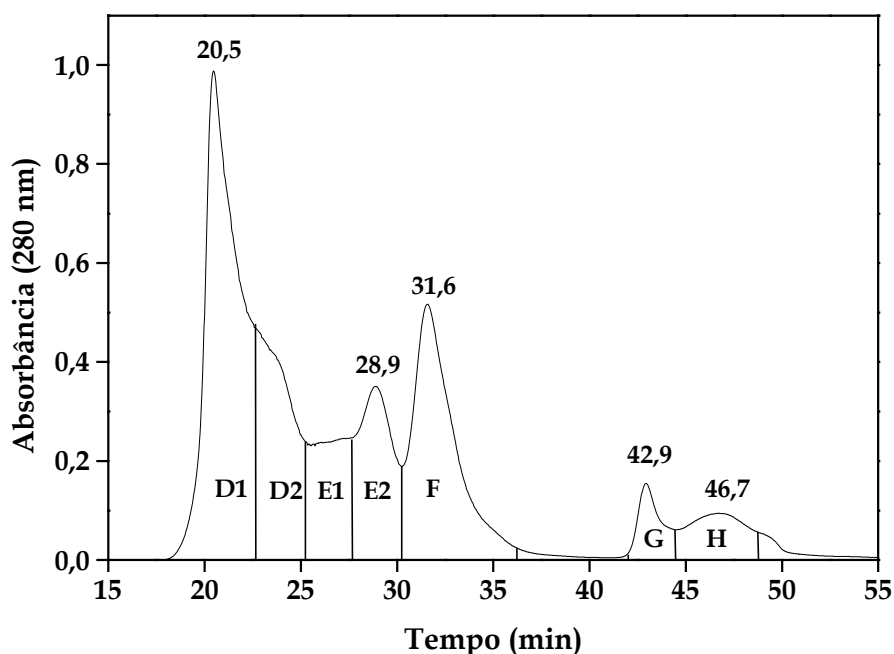


Figura 4.7: Cromatografia de permeação em gel de alto desempenho na coluna Protein Pak 300 sw; fase móvel tampão PBS 0,1 M pH 7,4, vazão 0,25 mL/min, injeções de 200  $\mu$ L, 25  $^{\circ}$ C.

As quantidades de imunoglobulinas e albumina detectadas na amostra de injeção, nos picos e frações são mostradas na Tabela 4.10. Na fração D1 detectou-se predominantemente IgM e quantidade pequena de IgE e IgA. As imunoglobulinas E e A

continuaram a ser eluídas da coluna (fração D2), juntamente com IgG (frações E1 e E2). Albumina não foi detectada em nenhum pico, provavelmente devido à baixa concentração. A maior quantidade de IgE total foi detectada na fração E1, a qual foi considerada a solução final enriquecida em IgE, que também continha IgA e IgG. Como resultado, obteve-se percentagem de recuperação de IgE total (%Recup<sub>IgE</sub>) igual a 80,4% e fator de enriquecimento em IgE em relação aos isotipos IgA, IgG, IgM e à albumina (FE) igual a 3,4. Os cálculos são detalhados no Apêndice A.

Tabela 4.10: Quantidade de imunoglobulinas, albumina e IgE<sub>Relat</sub>\* presentes nas amostras de injeção, picos e frações obtidos na cromatografia de permeação em gel, vazão 0,25 mL/min.

Amostras	Quantidade (mg)					IgE <sub>Relat</sub> (%)
	IgM	IgE total***	IgA	IgG	Albumina	
Injeção**	0,114	3,29 x 10 <sup>-4</sup>	9,42 x 10 <sup>-2</sup>	6,70 x 10 <sup>-2</sup>	7,46 x 10 <sup>-3</sup>	0,1164
fração D1	0,095	4,28 x 10 <sup>-5</sup>	1,55 x 10 <sup>-2</sup>	ND	ND	0,048
fração D2	ND	5,32 x 10 <sup>-5</sup>	1,64 x 10 <sup>-2</sup>	ND	ND	0,261
<b>fração E1</b>	ND	<b>2,65 x 10<sup>-4</sup></b>	<b>5,66 x 10<sup>-2</sup></b>	<b>1,06 x 10<sup>-2</sup></b>	ND	0,392
fração E2	ND	5,04 x 10 <sup>-5</sup>	7,07 x 10 <sup>-3</sup>	3,49 x 10 <sup>-2</sup>	ND	0,120
pico F	ND	ND	ND	ND	ND	ND
pico G	ND	ND	ND	ND	ND	ND
pico H	ND	ND	ND	ND	ND	ND

\* IgE<sub>Relat</sub> = percentagem em massa de IgE total em relação a IgA, IgG, IgM e albumina (Eq. 6 e Eq. 7)

\*\* volume de injeção, 200 µL.

\*\*\* 1 kU (unidade de anticorpo) equivale a 2,8 x 10<sup>-3</sup> mg.

ND: valores não detectáveis (abaixo do limite de detecção do método).

Na tentativa de se melhorar o fator de enriquecimento obtido, realizou-se uma cromatografia de permeação em gel empregando-se o tampão Tris-acetato 0,1 M pH 7,0 como fase móvel (um dos tampões indicados pelo fabricante da coluna), sendo as outras condições operacionais similares às da Figura 4.7. Não se obteve uma fração rica em IgE, e sim, várias frações contendo quantidades similares de IgE juntamente com as outras

imunoglobulinas (dados não mostrados), indicando portanto que a separação foi inadequada.

Comparando-se os resultados obtidos nos ensaios a partir do soro-K e do soro-G (Tabela 4.11), verifica-se que os valores de %Recup<sub>IgE</sub> e FE para o soro-G foram menores. A grande perda de IgE constatada na etapa de evaporação do ensaio com soro-G, prejudicou a recuperação de IgE na etapa de afinidade. Entretanto, ao se concentrar mais a amostra, alcançou-se um resultado mais confiável, uma vez que se pôde detectar IgA nas frações dos picos resultantes da HPGPC (Tabela 4.10), o que não foi possível no experimento preliminar (Tabela 4.7). Com a detecção de IgA na solução final enriquecida em IgE resultante do ensaio com soro-G, obteve-se um valor de FE menor (FE, 3,4) do que com o soro-K (FE, 12,6) e constatou-se que a coluna Protein Pak 300 sw não foi adequada para separar IgA, IgE e IgG, nas condições empregadas. O valor de FE da etapa de afinidade a partir do soro-G também foi menor do que a partir do soro-K, provavelmente devido ao alto teor de IgA presente no soro-G, que levou à saturação da coluna agarose-jacalina e à adsorção de grande quantidade daquela imunoglobulina na Sepharose-con A.

Tabela 4.11: Comparação dos valores de porcentagens de recuperação (%Recup<sub>IgE</sub>) e fator de enriquecimento em IgE em relação aos isotipos IgA, IgG, IgM e à albumina (FE), obtidos nas etapas de afinidade e permeação em gel (HPGPC) dos ensaios a partir do soro-K e do soro-G.

	%Recup <sub>IgE</sub>			FE		
	Afinidade	HPGPC	Global*	Afinidade	HPGPC	Global**
soro-K	57,3	79,1	45,3	26,3	12,6	331
soro-G	45,5	80,4	36,6	22,3	3,4	75,8

\* %Recup<sub>IgE</sub> global = recuperação de IgE considerando-se as etapas de afinidade e permeação em gel, calculado pela multiplicação da %Recup<sub>IgE</sub> de ambas as etapas.

\*\* FE global = fator de enriquecimento em IgE em relação aos isotipos IgA, IgG, IgM e à albumina considerando-se as etapas de afinidade e permeação em gel, calculado pela multiplicação do FE de ambas as etapas

As amostras de injeção e dos picos obtidos na etapa de HPGPC (Tabela 4.10) também foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE seguida de “immunoblotting” (Figura 4.8), a fim de se confirmar a presença da imunoglobulina do isotipo E, na solução

final enriquecida em IgE. As bandas visualizadas nas faixas 2 a 5 da Figura 4.8-B correspondem àquela imunoglobulina presente nas amostras de injeção, frações D1, D2 e E1, respectivamente. As bandas acima de 212 kDa indicam que provavelmente parte das moléculas de IgE se agregaram. No entanto, na solução final enriquecida (fração E1, faixa 5), verificou-se apenas uma banda próxima a 212 kDa, indicando que as moléculas de IgE se encontravam em forma de monômeros.

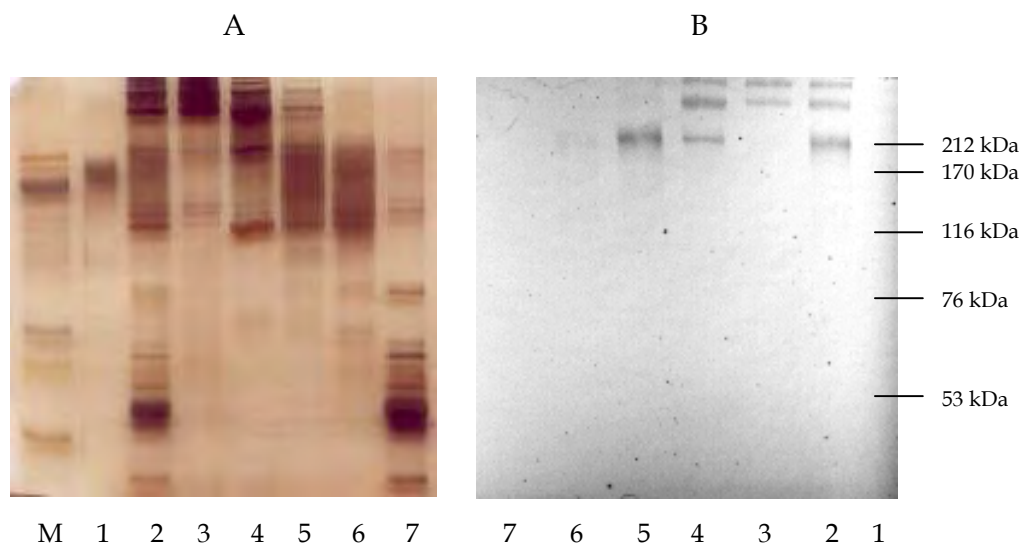


Figura 4.8: Eletroforese SDS-PAGE (A) e “immunoblotting” (B) das frações de cromatografia de permeação em gel de alto desempenho na coluna Protein Pak 300 sw. Faixa M: marcadores de massa molecular da Amersham Biosciences (miosina 212 kDa;  $\alpha$ -2-macroglobulina 170 kDa;  $\beta$ -galactosidase 116 kDa; transferrina 76 kDa e desidrogenase glutâmica 53 kDa; faixa 1: IgG humana (Aventis Behring, Alemanha); faixa 2: injeção; faixa 3: fração D1; faixa 4: fração D2; faixa 5: fração E1; faixa 6: fração E2; faixa 7: pico F.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Dentre os adsorventes estudados, o gel agarose-*Lens culinaris* mostrou-se o mais promissor para aplicação na terapia de adsorção seletiva de IgE através de circulação extracorpórea, uma vez que atendeu aos critérios de seleção estabelecidos. Apesar do gel Sepharose-con A ter apresentado bons resultados de capacidade de retenção de IgE, não atendeu ao critério de biocompatibilidade, importante para aplicação clínica. Este adsorvente foi selecionado para utilização em etapas intermediárias (obtenção de solução enriquecida em IgE) do processo de purificação de IgE.

Nos ensaios cromatográficos com o gel agarose-*Lens culinaris*, verificou-se que a velocidade superficial ( $v$ , cm/min) do plasma não influenciou efetivamente na adsorção de IgE na faixa estudada. Por outro lado, o número de passagens de plasma pela coluna (npp), a razão entre volume de plasma e volume de leito ( $vp/vl$ ) e a temperatura ( $T$ , °C), mostraram efeito sobre a adsorção de IgE. As condições experimentais mais favoráveis à adsorção de IgE foram,  $v$ , 0,78 cm/min, npp, 1,  $vp/vl$ , 2,85 e  $T$ , 25 °C.

Nos experimentos de simulação *in vitro* de circulação extracorpórea, o gel agarose-*Lens culinaris* mostrou desempenho insatisfatório quando comparado a dados da literatura do gel Sepharose-CL-4B-anti IgE. No entanto, esse resultado pode estar relacionado às baixas concentrações de IgE presentes na amostra de plasma-K.

Nos estudos de adsorção de IgE visando obtenção de solução enriquecida em IgE como uma das etapas do processo de purificação de IgE, todas as imunoglobulinas estudadas e a albumina foram adsorvidas em Sepharose-con A, predominantemente IgE e IgM, resultando em fatores de enriquecimento (etapa de afinidade) iguais a 26,3 e 22,3, nos ensaios a partir do soro-K e do soro-G, respectivamente.

Nos ensaios a partir do soro-G, a recuperação de IgE alcançada na etapa de HPGPC foi maior do que na etapa de afinidade; nesta última, a baixa recuperação esteve relacionada com perdas de proteínas durante a evaporação, através da formação de cristais.

Apesar da alta recuperação obtida ( $\%Recup_{IgE}$ , 80,4%), a coluna de permeação em gel não foi adequada para remover IgA e IgG da solução enriquecida em IgE, o que foi mostrado pelo baixo fator de enriquecimento em IgE em relação aos isotipos IgA, IgG, IgM e à albumina (FE, 3,4) obtido no ensaio a partir do soro-G.

Como resultado das etapas de cromatografia de afinidade e de permeação em gel, a partir do soro-G, recuperou-se 36,6% de IgE e obteve-se fator de enriquecimento em IgE em relação aos isotipos IgA, IgG, IgM e à albumina igual a 75,8. Constatou-se a presença de IgA e IgG na solução final enriquecida em IgE.

A presença da imunoglobulina do isotipo E na solução final enriquecida em IgE foi confirmada por meio de “immunoblotting”, no qual visualizou-se uma única banda próxima a 212 kDa na faixa correspondente à fração rica em IgE. O resultado dessa análise também indicou a provável agregação de moléculas de IgE, indicada pela visualização de bandas acima de 212 kDa, na fração de injeção e nas frações D1 e D2.

Como sugestões para trabalhos futuros, tem-se:

1. Experimentos a partir de amostras plasmáticas com concentrações mais elevadas de IgE, poderiam ser realizados para se avaliar melhor o desempenho do gel agarose-*Lens culinaris*, uma vez que ele apresenta custos mais atrativos e maior facilidade de obtenção do que Sepharose-CL-4B-anti IgE;

2. Emprego de duas colunas de permeação em gel em série, a fim de se melhorar a separação de IgA, IgE e IgG.

## CAPÍTULO 6

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**, Philadelphia, W.B. Saunders, 4ª ed., 2000.
- ADACHI, T.; MOGI, M.; HARADA, M.; KOJIMA, K. Selective removal of immunoglobulin E from rat blood by membrane-immobilized antibody. **Journal of Chromatography B**, v.668, n.2, p.327-332, 1995.
- AUCOUTURIER, P. & PREUDHOMME, J.L. A simple procedure for the isolation of human secretory IgA of IgA1 and IgA2 subclass by a jackfruit lectin, jacalin, affinity-chromatography. **Molecular Immunology**, v.25, n.3, p.321-322, 1988.
- AVENHAUS, B.; AVENHAUS, W.; SCHNEIDER, M.; DOMSCHKE, W.; GAUBITZ, M. Development of an *in vitro* miniature model to simulate immunoabsorption in patients with Systemic Lupus Erythematosus. **Journal of Clinical Apheresis**, v.17, p.183-189, 2002.
- BARNES, P.J. New directions in allergic diseases: mechanism-based anti-inflammatory therapies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.106, n.1, p.5-16, 2000.
- BEHM, E.; KURODA, T.; YAMAWAKI, N., 1987 *apud* IKONOMOV, V.; SAMTLEBEN, W.; SCHMIDT, B.; BLUMENSTEIN, M.; GURLAND, H.J. Adsorption profile of commercially available adsorbents: an *in vitro* evaluation. **The International Journal of Artificial Organs**, v.15, n.5, p.312-319, 1992.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BURNOUF, T.; GOUBRAN, H.; RADOSEVICH, M. Application of bioaffinity technology in therapeutic extracorporeal plasmapheresis and large-scale fractionation of human plasma. **Journal of Chromatography B**, v.715, p.65-80, 1998.
- CARLSSON, J.; JANSON, J.; SPARRMAN, M. **Affinity chromatography in: Protein purification: principles, high resolution methods and applications**, Ed. Janson, J.; Rydén, L., Ed. VCH Publishers, New York, 1989.
- CASOLARO, V.; GEORAS, S.N.; SONG, Z.; ONO, S.J. Biology and genetics of atopic disease. **Current Opinion in Immunology**, v.8, p.796-803, 1996.
- CHEUNG, A.K. & LEMKE, H. Criteria and standardization for biocompatibility. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.9, n.2, p.72-76, 1994.
- FERREIRA, A.B.H. **Dicionário da Língua Portuguesa**. Rio de Janeiro, Nova Fronteira, 1993.
- GARTMANN, J.; GROB, P.; FREY, M. Plasmapheresis in severe asthma. **The Lancet**, v.2, n. 8079, p.40-40, 1978.
- GOLDEN, D.B.K. Insect sting allergy and venom immunotherapy: A model and a mystery. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.115, n.3, p.439-447, 2005.
- GOLDSTEIN, I.J. & PORETZ, R.D. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins in: **The lectins. Properties, functions, and applications in biology and medicine**. Eds. LIENER, I.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. Ed. Academic Press, Inc, New York, p.33-247, 1986.



- GORCHAKOV, V.D.; SAKODYNSKII, K.I.; LEBEDIN, Y.S.; CHUCHALIN, A.G.  
Immunoabsorbents for clinical use: *ex vivo* immunoglobulin E removal in allergy.  
**Journal of Chromatography, Biomedical Applications**, v.563, n.1, p.166-171, 1991.
- GOUNNI, A. S.; LAMKHIOUED, B.; OCHIAL, K.; TANAKA, Y.; DELAPORTE, E.;  
CAPRON, A.; KINET, J.P.; CAPRON, M. High-affinity IgE receptor on eosinophils is  
involved in defense against parasites. **Nature**, v.367, n.6459, p.183-186, 1994.
- GREAVES, M. Chronic urticaria. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.105, n.4,  
p.664-672, 2000.
- GREGORY, R.L.; RUNDEGREN, J.; ARNOLD, R.R. Separation of human IgA1 and IgA2  
using jacalina-agarose chromatography. **Journal of Immunological Methods**, v.99,  
p.101-106, 1987.
- HAGIWARA, k.; COLLET-CASSART, D.; KOBAYASHI, K.; VAERMAN, J.P. Jacalin:  
isolation, characterization and influence of various factors on its interaction with  
human IgA1, as assessed by precipitation and latex agglutination. **Molecular  
Immunology**, v.25, p.69-83, 1988.
- HAUN, M.; INCLEDON, B.; ALLES, P.; WASI, S. A rapid procedure for the purification of  
IgA1 and IgA2 subclasses from normal human-serum using protein-G and jackfruit  
lectin (jacalin) affinity-chromatography. **Immunology Letters**, v.22, n.4, p.273-280,  
1989.
- IKEYAMA, S.; NAKAGAWA, S.; ARAKAWA, M.; SUGINO, H.; KAKINUMA, A.  
Purification and characterization of IgE produced by human myeloma cell line, U266.  
**Molecular Immunology**, v.23, n.2, p.159-167, 1986.
- IKONOMOV, V.; SAMTLEBEN, W.; SCHMIDT, B.; BLUMENSTEIN, M.; GURLAND, H.J.  
Adsorption profile of commercially available adsorbents: an *in vitro* evaluation. **The  
International Journal of Artificial Organs**, v.15, n.5, p.312-319, 1992.

- ISHIZAKA, K. & ISHIZAKA, T., 1967 *apud* JOHANSSON, S.G.O. Discovery and development of IgE assays. **Clinical and Experimental Allergy**, v.27, suplemento 1, p.60-63, 1997.
- JARDIEU, P. M. & FICK, R. B. IgE inhibition as a therapy for allergic disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.118, n.2-4, p.112-115, 1999.
- KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **Journal of Immunological Methods**, v.212, p.193-211, 1998.
- KENNEDY, J.F.; PALVA, P.M.G.; CORELLA, M.T.S.; CAVALCANTI, M.S.M.; COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v.26, p.219-230, 1995.
- KLEINE-TEBBE, J.; HAMILTON, R.G.; ROEBBER, M.; LICHTENSTEIN, L.M.; MACDONALD, S.M. Purification of immunoglobulin E (IgE) antibodies from sera with high IgE titers. **Journal of Immunological Methods**, v.179, p.153-164, 1995.
- KONDOH, H.; KOBAYASHI, K.; HAGIWARA, K.; KAJII, T. Jacalin, a jackfruit lectin, precipitates IgA1 but not IgA2 subclass on gel diffusion reaction. **Journal of Immunological Methods**, v.88, p.171-173, 1986.
- LASSALLE, P.H.; JOSEPH, M.; RAMON, P.H.; DRACON, M.; TONNEL, A.B.; CAPRON, A. Plasmapheresis in a patient with severe asthma associated with auto-antibodies to platelets. **Clinical and Experimental Allergy**, v.20, n.6, p.707-712, 1990.
- LEBEDIN, Y.S.; GORCHAKOV, V.D.; PETROVA, E.N.; KOBLYANSKY, A.G.; RAUDLA, L.A.; TATARSKY, A.R.; BOBKOV, E.V.; ADAMOVA, I.Y.; VASILOV, R.G.; NASONOV, E.L.; POKROVSKY, S.N.; CHUCHALIN, A.G. Ex vivo removal of IgE in atopic asthma by extracorporeal plasmoadsorption (EPIA): development of a clinical adsorbent. **International Journal of Artificial Organs**, v.14, p.508-514, 1991.

- LIENER, I.E.; SHARON, N.; GOLSTEIN, I.J. **The Lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine**, New York, Academic Press, 1986.
- LIS, H. & SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v.98, p.637-674, 1998.
- LOOMES, L.M.; STEWART, W.W.; MAZENGERA, R.L.; SENIOR, B.W.; KERR, M.A. Purification and characterization of human immunoglobulin IgA1 and IgA2 isotypes from serum. **Journal of Immunological Methods**, v.141, n.2, p.209-218, 1991.
- LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1383, p.9-36, 1998.
- LORIS, R.; STEYAERT, J.; MAES, D.; LISGARTEN, J.; PICKERSGILL, R.; WYNS, L. Crystal structure determination and refinement at 2.3-Å resolution of the lentil lectin. **Biochemistry**, v.32, n.34, p.8772-8781, 1993.
- MALCHESKY, P.S.; KAPLAN, A.; KOO, A.P.; SAKURADA, Y.; SIAMI, G.A. Are selective macromolecule removal plasmapheresis systems useful for autoimmune diseases or hyperlipidemia? **ASAIO Journal**, p.868-872, 1993.
- MORGAN, D.M.L., 1998 *apud* ZHAO, Z.; BALDO, B.A.; O'BRIEN, R.M.; PLOMLEY, R.F. Reaction with, and fine structural recognition of polyamines by human IgE antibodies. **Molecular Immunology**, v.37, p.233-240, 2000.
- MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 117, p.307-310, 1981.
- PENG, Z.; ARTHUR, G.; SIMONS, F.E.R.; BECKER, A.B. Binding of dog immunoglobulins G, A, M, and E to concanavalin A. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 36, n.1, p.83-88, 1993.

- RAY, P.K. & RAYCHAUDHURI, S. Differential binding affinity of immobilized concanavalin A-Sepharose 4B for normal and myelomatous immunoglobulins. **Biomedicine**, v.36, n.4, p.206-210, 1982.
- RICHTER, W.O.; DONNER, M.G.; SELAMIER, A.; HILLER, E.; SCHAWANDT, P. Efficacy and safety of immunoglobulin apheresis. **ASAIO Journal**, v.43, p.53-59, 1997.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. São Paulo, Manole Ltda, 5ª ed., 1999.
- ROQUE-BARREIRA, M.C. & CAMPOS-NETO, A. Jacalin, an IgA-binding lectin. **Journal of Immunology**, v.134, n.30, p.1740-1743, 1985.
- ROQUE-BARREIRA, M.C.; PRAZ, F.; HALBWACHS-MECARELLI, L.; GREENE, L.J.; CAMPOS-NETO, A. IgA-affinity purification and characterization of the lectin jacalin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.19, n.2, p.149-157, 1986.
- ROSÁRIO FILHO, N.A. **Alergia & Imunologia**. Rio de Janeiro, Cultura Médica, 2ª ed., 1991.
- SATISH, P.R. & SUROLIA, A. Exploiting lectin affinity chromatography in clinical diagnosis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.49, p.625-640, 2001.
- SATO, H.; WATANABE, K.; AZUMA, J.; KIDAKA, T.; HORI, M. Specific removal of IgE by therapeutic immunoadsorption system. **Journal of Immunological Methods**, v.118, n.2, p.161-168, 1989.
- SCHULTZ, A.; STUCK, B.A.; FEURING, M.; HÖRMANN, K.; WEHLING, M. Novel approaches in the treatment of allergic rhinitis. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v.3, p.21-27, 2003.
- SHIBASAKI, M.; SUMAZAKI, R.; ISOYAMA, S.; TAKITA, H. Interaction of lectins with human IgE: IgE-binding property and histamine-releasing activity of twelve plant lectins. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.98, n.1, p.18-25, 1992.

- SINGH, M.B. & BHALLA, P.L. Hypoallergenic derivatives of major grass pollen allergens for allergy vaccination. **Immunology and Cell Biology**, v.81, p.86-91, 2003.
- STEIN, M.D.; HOWARD, I.K.; SAGE, H.J. Studies on a phytohemagglutinin from Lentil. 4. Direct binding studies of *Lens-culinaris* Hemagglutinin with simple saccharides. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.146, n.1, p.353-355, 1972.
- SUTTON, B.J. & GOULD, H.J. The human IgE network. **Nature**, v.366, n.6454, p.421-428, 1993.
- TERCERO, J.C. & DIAZ-MAURINO, T. Affinity chromatography of fibrinogen on *Lens culinaris* Agglutinin immobilized on CNBr-activated Sepharose: study of the active groups involved in nonspecific adsorption. **Analytical Biochemistry**, v.174, p.128-136, 1988.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v.76, n.9, p.4350-4354, 1979.
- VENTURA, R.C.A. **Remoção de auto-anticorpos de amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes empregando filtração em membranas de afinidade**. Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. 99p. Dissertação de Mestrado.
- VIJAYALAKSHMI, M.A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. **Trends in Biotechnology**, v.7, p. 71-76, 1989.
- WEINSTEIN, Y.; GIVOL, D.; STRAUSBAUCH, P.H., 1972 *apud* PENG, Z.; ARTHUR, G.; SIMONS, F.E.R.; BECKER, A.B. Binding of dog immunoglobulins G, A, M, and E to concanavalin A. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 36, n.1, p.83-88, 1993.

YAMAZAKI, Z.; IDESUKI, Y.; ASANO, K., 1985 *apud* IKONOMOV, V.; SAMTLEBEN, W.; SCHMIDT, B.; BLUMENSTEIN, M.; GURLAND, H.J. Adsorption profile of commercially available adsorbents: an *in vitro* evaluation. **The International Journal of Artificial Organs**, v.15, n.5, p.312-319, 1992.

YAMAZAKI, Z.; IDESUKI, Y.; INOUE, N., 1989 *apud* IKONOMOV, V.; SAMTLEBEN, W.; SCHMIDT, B.; BLUMENSTEIN, M.; GURLAND, H.J. Adsorption profile of commercially available adsorbents: an *in vitro* evaluation. **The International Journal of Artificial Organs**, v.15, n.5, p.312-319, 1992.

ZAVÁZAL, V. & KRAUZ, V. Lectin-binding ability of immunoglobulin E and its participation in triggering of mast cells. **Folia Microbiologica**, v.30, n.3, p.237-246, 1985.

ZHAO, Z.; BALDO, B.A.; O'BRIEN, R.M.; PLOMLEY, R.F. Reaction with, and fine structural recognition of polyamines by human IgE antibodies. **Molecular Immunology**, v.37, p.233-240, 2000.

## APÊNDICE A

### A1. DADOS DE PORCENTAGEM DE REMOÇÃO

Nas Tabelas 1A e 2A estão representados os valores de porcentagens de remoção de IgE's total e específicas, correspondentes aos gráficos representados na Figura 4.1 do item 4.1.3 de "Resultados e Discussão".

Tabela 1A: Porcentagens de remoção (%R) de IgE total, IgE<sub>D1</sub> (*Dermatophagoides pteronyssinus*) e IgE<sub>D201</sub> (*Blomia tropicalis*) obtidas nos experimentos realizados em frascos agitados empregando-se o "pool". Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de amostras em triplicata.

Adsorventes	%R		
	IgE total	IgE <sub>D1</sub>	IgE <sub>D201</sub>
Sepharose	14 $\pm$ 3	24 $\pm$ 6	15 $\pm$ 7
Sepharose-con A	67 $\pm$ 2	79 $\pm$ 0	78 $\pm$ 1
Agarose- <i>Lens culinaris</i>	63 $\pm$ 2	58 $\pm$ 1	59 $\pm$ 1
Agarose-D-triptofano	15 $\pm$ 1	44 $\pm$ 3	39 $\pm$ 3
Agarose-poli-L-lisina	10 $\pm$ 3	40 $\pm$ 5	36 $\pm$ 5
Agarose-aminohexil	12 $\pm$ 1	27 $\pm$ 4	24 $\pm$ 7

Tabela 2A: Porcentagens de remoção (%R) de IgE total obtidas nos experimentos realizados em frascos agitados empregando-se o controle negativo A. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de amostras em triplicata.

<b>Adsorventes</b>	<b>%R IgE total</b>
Sepharose	10 $\pm$ 1
Sepharose-con A	37 $\pm$ 3
Agarose- <i>Lens culinaris</i>	41 $\pm$ 1
Agarose-D-triptofano	17 $\pm$ 1
Agarose-poli-L-lisina	9 $\pm$ 3
Agarose-aminohexil	14 $\pm$ 6

Na Tabela 3A estão representados os valores de porcentagens de remoção de imunoglobulinas A, G, M e albumina, correspondentes aos gráficos representados na Figura 4.2 do item 4.1.4 de “Resultados e Discussão”.

Tabela 3A: Porcentagens de remoção (%R) de IgA, IgG, IgM e albumina dos suportes estudados obtidas nos experimentos realizados em frascos agitados empregando-se o “pool”. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de amostras em triplicata.

<b>Adsorventes</b>	<b>%R</b>			
	<b>IgA</b>	<b>IgG</b>	<b>IgM</b>	<b>Albumina</b>
Sepharose	30 $\pm$ 3	24 $\pm$ 1	20 $\pm$ 1	26 $\pm$ 4
Sepharose-con A	41 $\pm$ 1	23 $\pm$ 1	55 $\pm$ 1	17 $\pm$ 2
Agarose- <i>Lens culinaris</i>	33 $\pm$ 2	19 $\pm$ 1	9 $\pm$ 3	18 $\pm$ 1
Agarose-D-triptofano	26 $\pm$ 1	31 $\pm$ 2	30 $\pm$ 1	19 $\pm$ 2
Agarose-poli-L-lisina	28 $\pm$ 2	24 $\pm$ 3	50 $\pm$ 3	25 $\pm$ 1
Agarose-aminohexil	26 $\pm$ 5	24 $\pm$ 5	19 $\pm$ 6	25 $\pm$ 5



## A2. CÁLCULOS DE PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO E FATOR DE ENRIQUECIMENTO EM IgE EM RELAÇÃO AOS ISOTIPOS IgA, IgG, IgM E À ALBUMINA

Os cálculos de porcentagem de recuperação (%Recup<sub>IgE</sub>) e fator de enriquecimento em IgE em relação aos isotipos IgA, IgG, IgM e à albumina (FE) são referentes às etapas de cromatografia de afinidade (item 4.3.1) e de permeação em gel (item 4.3.2). Os cálculos referentes aos itens 4.3.3 e 4.3.4 não foram detalhados, uma vez que são similares aos detalhados abaixo.

### Cromatografia de afinidade:

A partir da Eq. 4:

$$\% \text{Re cup}_{\text{IgE}} = \frac{E_{\text{IgE}}}{I_{\text{IgE}}} \times 100$$

e dos valores mostrados na Tabela 4.6:

$$E_{\text{IgE}} = 8,64 \times 10^{-4} \text{ mg} \quad \text{e} \quad I_{\text{IgE}} = 1,51 \times 10^{-3} \text{ mg}$$

Obtém-se:

$$\% \text{Re cup}_{\text{IgE}} = \frac{8,64 \times 10^{-4}}{1,51 \times 10^{-3}} \times 100$$

$$\% \text{Re cup}_{\text{IgE}} = 57,2\%$$

A partir da Eq. 6:

$$E_{\text{Relat}} = \frac{E_{\text{IgE}}}{E_{\text{IgE}} + E_{\text{Ig}} + E_{\text{Alb}}} \times 100$$

e dos valores mostrados na Tabela 4.6:

$$E_{IgE} = 8,64 \times 10^{-4} \text{ mg}$$

$$E_{Ig} = 0,3498 + 0,5445 + 2,0196 = 2,9139 \text{ mg}$$

$$E_{Alb} = 0,14223 \text{ mg}$$

Obtém-se:

$$E_{Relat} = \frac{8,64 \times 10^{-4}}{8,64 \times 10^{-4} + 2,9139 + 0,14223} \times 100$$

$E_{Relat} = 2,826 \times 10^{-2} \%$ , o qual é mostrado na Tabela 4.6 como  $IgE_{Relat}$  (%) da solução enriquecida em IgE.

A partir da Eq. 7:

$$I_{Relat} = \frac{I_{IgE}}{I_{IgE} + I_{Ig} + I_{Alb}} \times 100$$

e dos valores mostrados na Tabela 4.6:

$$I_{IgE} = 1,51 \times 10^{-3} \text{ mg}$$

$$I_{Ig} = 1,91 + 33,92 + 2,81 = 38,64 \text{ mg}$$

$$I_{Alb} = 101,45 \text{ mg}$$

Obtém-se:

$$I_{Relat} = \frac{1,51 \times 10^{-3}}{1,51 \times 10^{-3} + 38,64 + 101,45} \times 100$$

$I_{Relat} = 1,078 \times 10^{-3} \%$ , o qual é mostrado na Tabela 4.6 como  $IgE_{Relat}$  (%) da injeção

A partir da Eq. 5:

$$FE = \frac{E_{Relat}}{I_{Relat}} \quad (5)$$

e dos valores de  $E_{\text{Relat}}$  e  $I_{\text{Relat}}$  calculados anteriormente, obtém-se:

$$FE = \frac{2,826 \times 10^{-2}\%}{1,078 \times 10^{-3}\%}$$

$$FE = 26,2$$

#### Cromatografia de permeação em gel:

A partir da Eq. 4 e dos valores para a fração B2 mostrados na Tabela 4.7:

$$E_{\text{IgE}} = 4,144 \times 10^{-5} \text{ mg} \quad \text{e} \quad I_{\text{IgE}} = 5,236 \times 10^{-5} \text{ mg}$$

Obtém-se:

$$\% \text{ Recup}_{\text{IgE}} = \frac{4,144 \times 10^{-5}}{5,236 \times 10^{-5}} \times 100$$

$$\% \text{ Recup}_{\text{IgE}} = 79,1\%$$

A partir da Eq. 6 e dos valores para a fração B2 mostrados na Tabela 4.7:

$$E_{\text{IgE}} = 4,144 \times 10^{-5} \text{ mg}$$

$$E_{\text{Ig}} = 1,175 \times 10^{-2} \text{ mg}$$

$$E_{\text{Alb}} = 0 \text{ mg}$$

Obtém-se:

$$E_{\text{Relat}} = \frac{4,144 \times 10^{-5}}{4,144 \times 10^{-5} + 1,175 \times 10^{-2} + 0} \times 100$$

$$E_{\text{Relat}} = 0,3527\%, \text{ o qual é mostrado na Tabela 4.7 como } I_{\text{gE}} E_{\text{Relat}} (\%) \text{ da fração B2.}$$

A partir da Eq. 7 e dos valores para a fração B2 mostrados na Tabela 4.7:

$$I_{\text{IgE}} = 5,236 \times 10^{-5} \text{ mg}$$

$$I_{\text{g}} = 1,98 \times 10^{-2} + 3,7 \times 10^{-2} + 1,2 \times 10^{-1} = 1,77 \times 10^{-1} \text{ mg}$$

$$I_{\text{Alb}} = 8,8 \times 10^{-3} \text{ mg}$$

Obtém-se:

$$I_{\text{Relat}} = \frac{5,236 \times 10^{-5}}{5,236 \times 10^{-5} + 1,77 \times 10^{-1} + 8,8 \times 10^{-3}} \times 100$$

$I_{\text{Relat}} = 2,799 \times 10^{-2}\%$ , o qual é mostrado na Tabela 4.7 como  $I_{\text{gE Relat}} (\%)$  da injeção.

A partir da Eq. 5 e dos valores de  $E_{\text{Relat}}$  e  $I_{\text{Relat}}$  calculados anteriormente, obtém-se:

$$FE = \frac{0,3527\%}{2,799 \times 10^{-2}\%}$$

$$FE = 12,6$$

Considerando-se as duas etapas:

$$\% \text{ Re cup}_{I_{\text{gE}}}(\text{global}) = 0,573 \times 0,791 \times 100$$

$$\% \text{ Re cup}_{I_{\text{gE}}}(\text{global}) = 45,3\%$$

$$FE(\text{global}) = 26,2 \times 12,6$$

$$FE(\text{global}) = 331$$