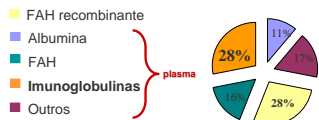


Juliana Rodrigues Caro¹, Igor T. L. Bresolin² e Sônia M. A. Bueno³

¹Aluna bolsista PIBIC/CNPq, ²Co-orientador, ³Orientadora
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Departamento de Processos Biotecnológicos
Caixa Postal 6066 - CEP 13083-970 - Campinas – SP, sonia@feq.unicamp.br

Introdução

Mercado Mundial de Hemoderivados: US\$ 20 bi (2004)
Brasil importa R\$ 100 milhões por ano



Coleta de plasma humano para fracionamento no mundo: 25 milhões de litros

As imunoglobulinas pertencem a um grupo relacionado a glicoproteínas compostas de 82 a 96% de proteínas e 4 a 18% de carboidratos. São sintetizadas em resposta à introdução de um antígeno.

Compostos destinados a aplicações terapêuticas e diagnósticas → alto grau de pureza e necessitam de técnicas de purificação mais seletivas

Utilização da IgG humana:

Imunodeficiências congênitas ou adquiridas;
Deficiências seletivas de anticorpos;
Tratamento de alguns tipos de câncer;
Aplicações diagnósticas, laboratoriais e doenças auto-imunes.

Proposta do Trabalho:

Purificação de IgG a partir do soro humano por meio de cromatografia negativa em gel agarose-TREN, visando otimizar condições de alimentação e determinar as capacidades dinâmicas e estáticas do adsorvente.

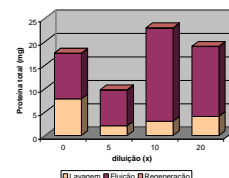
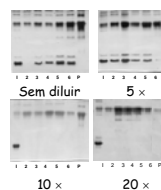


Figura 1: Imunoglobulina G

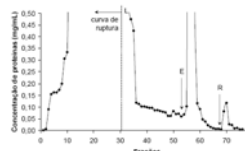
Resultados

Efeito da diluição do soro na alimentação

Tampão MES 25 mM, pH 6,0



Curva de ruptura:



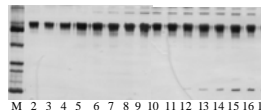
Leito: 3,0 mL agarose-TREN

Alimentação: Soro diluído 10 x → ~120 mg PT

Ponto de ruptura: ponto onde iniciou a saída de albumina da coluna

Etapas subsequentes: lavagem, eluição e regeneração

Capacidade dinâmica: 28,4 mg/mL gel



Metodologia

Experimentos cromatográficos

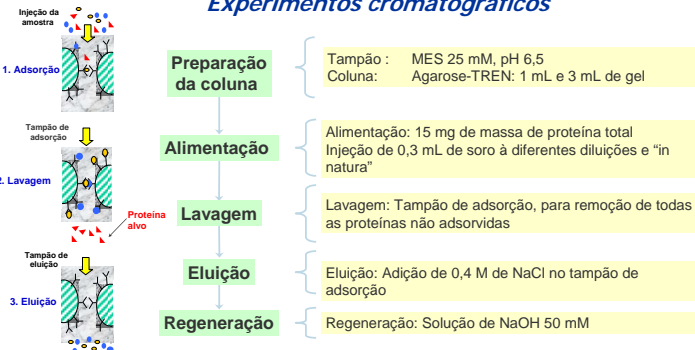
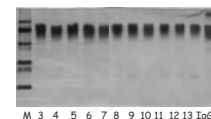
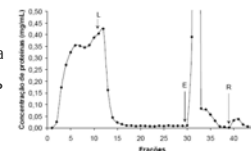


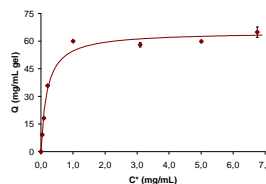
Figura 2: Sistema cromatográfico

Reprocessamento das frações impuras da curva de ruptura

- “pool” das frações de 12 a 25 da curva de ruptura, 40% de pureza
- Pureza máxima atingida: **96,9%**
- IgG comercial: 98,3% de pureza



Isoterma de Adsorção



Q_{max} : $64,96 \pm 2,04$ mg de proteínas totais do soro humano por mL de gel.
 $R^2 = 0,990$

Análise das frações

Dosagem de proteína total: método de Bradford [1]

Dosagem de IgG, IgA, IgM, albumina e transferrina: nefelometria (Array 360 System - Beckman, EUA).

Eletroforese SDS-PAGE: condições não redutoras, gel a 7,5% de poli(acrilamida) conforme Laemmli [2] e revelação com nitrato de prata de acordo com o procedimento de Morrissey [3]

Conclusões

Diferentes diluições do soro humano na etapa de alimentação afetam a seletividade do adsorvente agarose-TREN: IgG humana purificada na etapa de lavagem, quando o soro está diluído, pelo menos, dez vezes.

As capacidades dinâmica e máxima determinadas demonstraram que é factível utilizar o gel agarose-TREN para adsorção de proteínas do soro humano como alternativa à purificação de IgG.

Referências Bibliográficas

- [1] BRADFORD, M. M. Anal. Biochem., 72, 248-254, 1976.
- [2] LAEMMLI, U. K. Nature, 227, 680-685, 1970.
- [3] MORRISSEY, J. H. Anal. Biochem., 117, 307-310, 1981.