



MICROESFERAS DE QUITOSANA/ALGINATO EPOXILADAS COM CORANTES IMOBILIZADOS COMO ADSORVENTES APLICADOS NA PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS IgG1

B.A.B.Gonçalves¹; G.D.Gasparetto¹; F.R.Braz¹; D. R. Gondim²; I. J. Silva Jr²; G.A.M. Hirata³; I. T. L. Bresolin¹

1- Departamento de Ciências Exatas e da Terra – Universidade Federal de São Paulo
Rua São Nicolau, 210 –CEP: 09913-030 – Diadema/SP – Brasil
Email: bresolin@unifesp.br

2- Departamento de Engenharia Química – Universidade Federal do Ceará, Grupo de Pesquisa em Separações por Adsorção – GPSA. CEP: 60455-760 – Fortaleza/CE, Brasil.

3- Departamento de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas.
Rua Monteiro Lobato, 80. Cidade Universitária, 13083-862 – Campinas/SP – Brasil

RESUMO: Anticorpos Monoclonais (AcMos) têm sido largamente empregados em testes imunquímicos e imunodiagnósticos para detecção e caracterização de diversas moléculas de interesses na área clínica e pesquisa biomédica. Portanto, tentou-se recuperar e purificar os AcMos anti-TNP a partir do sobrenadante de cultura celular visando sua posterior aplicação na composição de kits de diagnóstico. Para tal, utilizou-se a purificação em uma única etapa usando cromatografia de afinidade com corantes imobilizados em microesferas de quitosana/alginato epoxiladas. Foram realizados testes cromatográficos nos quais se utilizou adsorventes à base de microesferas de quitosana/alginato epoxilados imobilizados com diferentes corantes como: Reativo Verde e o Procion Blue MX-R. Experimentos com o adsorvente imobilizado juntamente com os corantes citados mostraram que houve separação de boa parte da albumina na eluição e, portanto, trata-se de uma técnica promissora.

PALAVRAS-CHAVE: Anticorpos Monoclonais, Adsorção, Corante Imobilizado.

ABSTRACT: Monoclonal Antibodies (ACMOS) have been widely used in immunochemical and immunodiagnostic tests for detection and characterization of molecules of interest in various medical and biomedical research. Therefore, we attempted to recover and purify the anti-TNP ACMOS from cell culture supernatant aiming, its subsequent application in the composition of diagnostic kits. For this purpose, we used a one-step purification using affinity chromatography on immobilized dyes chitosan microspheres / epoxy alginate. Reactive Green and Procion Blue MX-R: chromatographic tests in which we used adsorbents based on chitosan microspheres / epoxy fatty acids alginate immobilized with different dyes were carried out as. Experiments with immobilized adsorbent along with the dyes cited showed that there was good separation of the albumin elution and therefore it is a promising technique.

KEYWORDS: Monoclonal Antibodies, Adsorption, Immobilized dyes.

1. INTRODUÇÃO

Quando uma substância estranha entra em um organismo, um aspecto da resposta imune que

pode ser ativado é o da secreção de anticorpos pelos linfócitos B que estão presentes no sangue. Tais linfócitos são responsáveis pela produção de moléculas de anticorpos denominadas



imunoglobulinas as quais agem como apresentadoras de antígeno para a degradação dessas substâncias estranhas por células como macrófagos ou células NK (Milstein et al, 1980).

Anticorpos monoclonais (AcMos) são imunoglobulinas produzidos por um único clone de linfócitos B normais, tumorais ou por meio da técnica de hibridomas, onde há a fusão de uma célula normal (linfócito B) com uma célula tumoral (mieloma). A partir disso são produzidos os hibridomas, onde os anticorpos monoclonais serão produzidos (Köhler e Milstein, 1975).

Os AcMos têm sido empregados para o uso terapêutico, como ligantes de cromatografia por afinidade e em testes imunodiagnósticos, entre outras aplicações que requerem elevado grau de pureza (superior a 95%). Por conta desta finalidade, é imprescindível que sejam mantidas suas propriedades biológicas, como detecção, reconhecimento e neutralização dos antígenos.

Entre as técnicas de purificação dos AcMos destaca-se a cromatografia por afinidade, que é uma técnica de adsorção baseada na habilidade de moléculas se ligarem especificamente e reversivelmente a moléculas complementares, os ligantes, imobilizados em uma matriz sólida, onde as moléculas que possuem afinidade pelo ligante são adsorvidas e depois eluídas pela mudança das condições da fase móvel, como pH, força iônica e adição de agentes competidores (Vijayalakshmi, 1989). Ligantes pseudobioespecíficos não possuem interação biológica, porém promovem interações reversíveis com a molécula alvo a ser separada.

Uma categoria destes ligantes envolve os corantes, que consistem de um cromóforo (corantes azo, antraquinona), ligado a um grupo reativo (normalmente um anel mono ou diclorotriazina) (Denizli e Piskin, 2001), que são capazes de interagir com os sítios ativos de muitas proteínas, como os anticorpos, apresentando diferentes níveis de especificidade e afinidade. Entre os corantes, destaca-se o Reativo Verde 5 (Figura 1) e o Procion Blue MX-R (Figura 2).

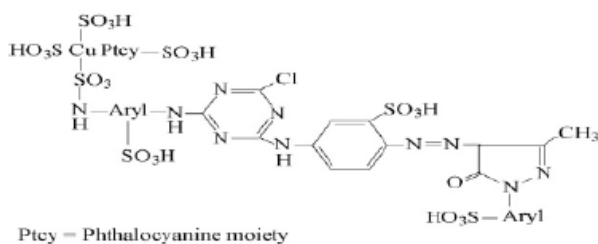


Figura 1: Estrutura Molecular do corante Reativo Verde 5 (Fonte: Bayramoglu et al., 2007).

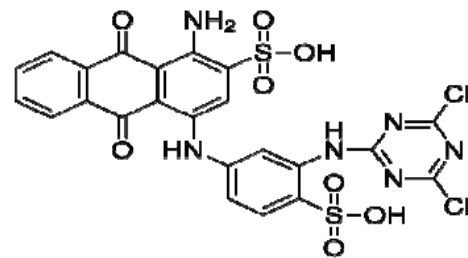


Figura 2: Estrutura Molecular do corante Reativo Azul 4 (Fonte: Sigma Aldrich)

Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de adsorventes alternativos com corantes para a purificação de AcMos, que apresentem baixo custo e alta capacidade de adsorção e seletividade, como por exemplo os adsorventes de quitosana os quais tem sido amplamente relatados na literatura (Kamari et al, 2009).

A quitosana é um biopolímero composto de unidades de D-glucosamina que pode ser obtido a partir da quitina pela desacetilação dos seus grupos acetamida em meio alcalino forte. O alginato também é um polímero natural encontrado em abundância extraído de algas marinhas marrons (Qin et al., 2007)], sendo composto de unidades D-mannuronate (M) e L-gluronate(G) unidas por ligações 1-4 glicosídicas, grupos carboxila permitem que tal polímero tenha a capacidade de sofrer uma transição sol-gel na presença de cátions polivalentes e mais especificamente com íons de cálcio (Rocher et al, 2008). Este polímeros tem sido amplamente relatados individualmente para a adsorção de bioprodutos (Shi et al., 2003; Hoven et al., 2007; Torres et al., 2007; Xu et al., 2009; Feng et al., 2009), porém existem poucos relatos de seu uso em conjunto para a formação da fase estacionária (adsorvente) em cromatografia de afinidade para a adsorção de biomoléculas como os AcMos.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo a purificação de AcMos anti-TNP a partir do sobrenadante de cultura celular utilizando-se técnica de adsorção seletiva utilizando corantes imobilizados em microesferas de quitosana/alginato epoxiladas visando sua posterior aplicação na composição de kits de diagnóstico, avaliando parâmetros como pureza, rendimento e seletividade.



2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Sobrenadante de cultivo celular

Sobrenadante de cultivo celular de hibridomas produzido em biorreator e contendo anticorpos monoclonais anti-TNP foi gentilmente fornecido pela Profa. Dra. Elisabeth de Fátima Pires Augusto do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT), campus São José dos Campos da Unifesp.

2.2. Microesferas de Quitosana e Alginato Epoxiladas com Corantes Imobilizados

As microesferas de quitosana/alginato epoxiladas com os corantes Reativo Verde H-4G e Procion Blue MX-R imobilizados sintetizadas conforme descrito por Gondim et al., 2012.

2.3. Ensaios Cromatográficos

Os experimentos cromatográficos foram realizados via cromatografia líquida de baixa pressão, utilizando coluna de vidro devidamente empacotada com os adsorventes de quitosana/alginato epoxilados com os corantes imobilizados. Foram avaliados tampões biológicos para as etapas de adsorção possuindo pH na faixa de 6,5 a 8,5, tais como ácido morfolinopropanosulfônico (Mops), Tris-hidroximetil aminometano (Tris-HCl) e fosfato de sódio, na concentração de 25 mmol/L. Como alimentação das cromatografias, foi utilizado 1 mL de sobrenadante de cultura celular diluído 5 vezes no tampão de adsorção (volume total de 5,0 mL). A dessorção (eluição) foi realizada pelo aumento da força iônica do tampão pela adição de NaCl 1 mol/L. Uma bomba peristáltica foi responsável por bombear os tampões para o interior da coluna, mantendo a vazão constante em 1,0 mL/min. Em todos os experimentos, frações da corrente de saída da coluna cromatográfica foram quantificadas em termo de proteína total, utilizando o método de Bradford (1976).

2.4. Métodos Analíticos

2.4.1. Proteína total: A concentração de proteína total nas amostras foi determinada usando o método de Bradford (1976), com BSA como proteína de referência ou a leitura direta de absorbância a 540 nm.

2.4.2. Eletroforese SDS-PAGE: As amostras proteicas obtidas nas cromatografias foram analisadas por eletroforese em condições desnaturantes e não-redutoras em géis de poli-acrilamida (SDS-PAGE), conforme Laemmli (1970) utilizando equipamento Mini-Protean III (BioRad, EUA). A revelação dos géis foi feita com nitrato de prata conforme procedimento descrito por Morrissey (1981).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de corantes tem seu destaque devido a presença de grupos característicos na sua estrutura molecular, o que gera a interação necessária para a adsorção de biomoléculas, o que os torna excelentes candidatos a serem utilizados como ligantes em cromatografia de afinidade.

Pela estrutura molecular dos corantes Reativo Verde (Figura 1) e Procion Blue MX-R (Figura 2) pode-se notar a presença de grupos ácidos SO_3^- , que apresentam afinidade com muitas biomoléculas, como no caso de proteínas e enzimas (Gondim, 2012).

De acordo com a literatura, o sistema tampão tem sua influência específica no caso de cada corante utilizado. Isso é concluído através da diferença do percentual da quantidade adsorvida existente na etapa da eluição entre os tampões utilizados. (Gondim, 2012) A partir dos resultados, pode-se perceber que o tampão Mops apresentou maior percentual nas duas colunas utilizadas em comparação com os tampões Tris-HCl e Fosfato de Sódio (dados não mostrados).

3.1. Ensaios Cromatográficos

Os ensaios iniciais foram realizados com adsorvente contendo quitosana/alginato juntamente com dois corantes distintos imobilizados, sendo eles: Reativo Verde e o Procion Blue MX-R. Diferentes faixas de pH foram testadas para que se conclui-se em qual haveria o melhor comportamento do adsorvente.

No adsorvente Procion Blue MX-R, em diferentes condições, pode-se observar semelhanças no perfil eletroforético, como no mostrado na Figura 3. Percebeu-se que houve uma diminuição na quantidade de albumina presente e, portanto, da porcentagem de 2,4% de proteína total eluída, calculada através de balanço de massa como ilustrado na Tabela 1, há a contribuição tanto da albumina como do anticorpo. E assim, observa-se que não houve



uma separação efetiva, pois foi encontrada albumina nas amostras da eluição.

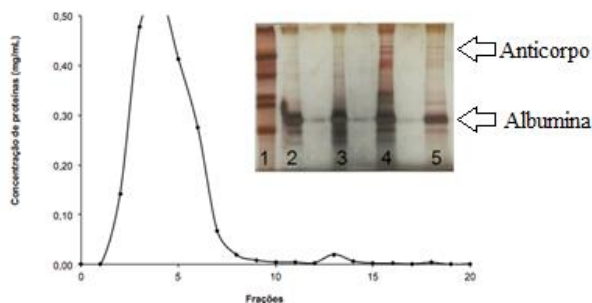


Figura 3: Cromatograma e eletroforese no adsorvente Procion Blue MR-X em tampão Mops pH 6,5. Injeção: 1 mL de sobrenadante celular. Vazão: 1 mL/min. Eletroforese: 1. Marcador de alta massa molecular, 2. Injeção, 3-4. Lavagens, 5. Eluição.

Tabela 1: Balanço de massa da Cromatografia no adsorvente Procion Blue MR-X em tampão Mops pH 6,5

Frações	(mg)	(%)
Injeção	3,24	100,0
Lavagem	3,34	103,2
Eluição	0,08	2,4
Recuperação	3,42	105,5

Já no ensaio cromatográfico da coluna de Reativo Verde em tampão Mops, também em pH 6,5 observou-se perfis semelhantes, como destacado na Figura 4.

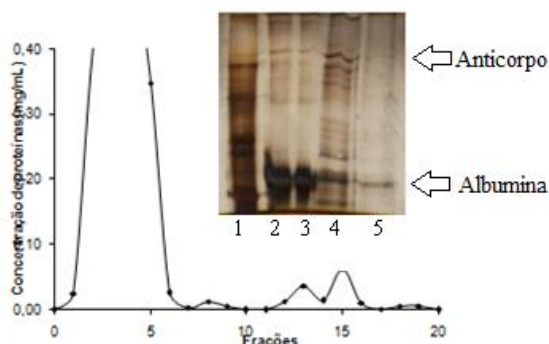


Figura 4: Cromatograma e eletroforese do adsorvente Reativo Verde em tampão Mops pH 6,5. Injeção: 1 mL de sobrenadante celular. Vazão: 1 mL/min. Eletroforese: 1. Marcador de alta massa molecular, 2. Injeção, 3. Lavagem, 4-5. Eluições.

Tabela 2: Balanço de massa em termos de proteína total da cromatografia no adsorvente Reativo Verde em tampão Mops pH 6,5

Frações	(mg)	(%)
Injeção	2,98	100,0
Lavagem	2,87	96,2
Eluição	0,23	7,6
Recuperação	3,10	104,0

O resultado mais eficiente apresentou-se com o reativo verde com o Mops em pH 6,5, onde a eluição apresentou uma porcentagem de 7,6% de proteínas recuperadas. Porém, ainda sim houve contribuição de albumina na porcentagem encontrada e assim, não havendo a purificação total dos AcMos.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se pelos experimentos executados com o adsorvente imobilizado com os corantes citados que houve separação de boa parte da albumina na eluição em determinadas condições e, portanto, a técnica utilizada é promissora.

REFERÊNCIAS

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.

Denizli, A.; Piskin, E. Dye-ligand affinity systems. *J. Biochem Biophys. Methods.* 49, 391-416, 2001.

Köhler, G.; Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497, 1975.

Le Moal, M.A.; Motta, I.; Truffa-Bachi, P. Improvement of an ELISA bioassay for the routine titration of murine interferon-gamma. *Res. Immunol.*, 140, 613-624, 1989.

Léo, P.; Ucelli, P.; Augusto, E.F.P.; Oliveira, M.S.; Tamashiro, W.M.S.C. Anti-TNP monoclonal antibodies as reagents for enzyme-immunoassay (ELISA). *Hybridoma*, 19, 473-478, 2000.

Morrissey, J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with

enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.*, 117, 307-310, 1981.

Tamashiro, W.M.S.C.; Augusto, E.F.P. Anticorpos Monoclonais. In: Moraes, A.M.; Augusto, E.F.P.; Castilho, L.R. (Org.). Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica, 2008.

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76, 4350-4354, 1979.

Voigt, A.; Zintl, F. Hybridoma cell growth and anti-neuroblastoma monoclonal antibody production in spinner flasks using a protein-free medium with microcarriers. *J. Biotechnol.*, 68, 213-226, 1999.

Vijayalakshmi, M. A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. *Trends Biotechnol.*, 7, 71-76, 1989.

Gondim, D. R.; Quitosana/ Alginato epoxilato com corantes imobilizados como potencial fase estacionária para purificação de IgG do soro humano, 75-80, 2012

Gondim D. R.; Lima L. P.; Souza M. C. M.; Bresolin I. T. L.; Adriano W. S.; Azevedo D. C. S.; Silva Jr. I. J.; Dye Ligand Epoxide Chitosan/ Alginate: A potential New Stationary Phase for Human IgG Purification. *Ads. Sci. & Technol.*, 8 & 9, 701- 710.