



ISSN: 1984-3151

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBTIPOS SLOW-MOVING E FAST-MOVING DE IMUNOGLOBULINA G A PARTIR DE SORO DE COELHO

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SLOW-MOVING AND FAST-MOVING IMMUNOGLOBULIN G SUBTYPES BY MEANS OF RABBIT SERUM

Ricardo Adriano Dorledo de Faria¹; Marina Lidiane Batista²; Luiz Guilherme Dias Heneine³

- 1 Graduando em Engenharia Química pelo Centro Universitário de Belo Horizonte - UniBH. Fundação Ezequiel Dias – FUNED. Belo Horizonte, MG. ricardo.adriano08@hotmail.com.
- 2 Graduanda em Engenharia Química pelo Centro Universitário de Belo Horizonte – UniBH. Fundação Ezequiel Dias – FUNED. Belo Horizonte, MG. marinalidiane@hotmail.com.
- 3 Pós-Doutor na área de Farmacologia, Instituto Pasteur, França. Pesquisador Pleno III na Fundação Ezequiel Dias – FUNED. Belo Horizonte, MG. heneinel@gmail.com.

Recebido em: 05/09/2013 - Aprovado em: 22/11/2011 - Disponibilizado em: 30/11/2011

RESUMO: A imunoglobulina G é a principal classe de anticorpos constituintes dos fluidos sanguíneos animais, tem massa de 150kDa e representa uma das estruturas mais importantes no sistema de defesa. Estas moléculas são largamente utilizadas em aplicações terapêuticas, imunodiagnósticos e purificação de outros anticorpos e antígenos em processos biomédicos, já que a purificação de proteínas limita os riscos de efeitos colaterais nos seres inoculados. Neste trabalho, imunoglobulinas G provenientes de soro de coelho foram obtidas por precipitação com sulfato de amônio saturado. A massa de IgG obtida correspondeu à cerca de 72,5% de todas as classes de imunoglobulinas presentes no soro. Em seguida, a IgG pura foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose, processo que segregou os subtipos slow-moving (durante a eluição com tampão fosfato pH6,3) e fast-moving (fração eluída com tampão fosfato pH8,0). A caracterização da imunoglobulina G pura foi dada por eletroforese em gel SDS-PAGE 10%, onde a amostra não reduzida revelou banda única de peso molecular igual a 150kDa e a amostra reduzida com 2-mercapto-etanol revelou banda de 50kDa referente à cadeia pesada e 25kDa das cadeias leves.

PALAVRAS-CHAVE: Imunoglobulina G. Anticorpo. Purificação.

ABSTRACT: Immunoglobulin G is the main class of antibodies of the animal blood components, its mass is equal to 150kDa and it represents one of the most important structures of defense system. These molecules are widely applied in therapeutic uses, immunodiagnostics and in other antibodies and antigens purification, since proteins purification limits risks of collateral effects in inoculated bodies. In this work, immunoglobulins G from rabbit serum were obtained by precipitation with saturated ammonium sulfate. The IgG's mass obtained corresponded to about 72,5% of all the immunoglobulins' classes of the serum. After, the pure IgG was submitted to a ion-exchange chromatography in a DEAE-Sepharose column, which segregates the slow-moving piece (during the phosphate buffer pH6,3 elution) and fast-moving piece (fraction eluted with phosphate buffer pH8,0). The characterization of the pure immunoglobulin G was carried out by a 10% SDS-PAGE electrophoresis, where the non-reduced sample showed a single band with molecular weight of 150kDa and the sample that was reduced with 2-mercaptoethanol revealed bands with 50kDa related to the heavy chains and 25kDa of the light chains.

KEYWORDS: Immunoglobulin G. Antibody. Purification.

1 INTRODUÇÃO

As imunoglobulinas consistem em um grupo altamente heterogêneo, produzidas em resposta a um imunógeno e que funcionam como anticorpos. A separação destas proteínas requer o uso de métodos físico-químicos convencionais, tais como: precipitação, cromatografia, filtração, entre outros. Estes métodos são utilizados para aumentar a diversidade, melhorar o rendimento e o grau de pureza das proteínas extraídas do plasma. A purificação das proteínas limita os riscos de efeitos colaterais nos seres inoculados (LEFKOVITS, 1979).

De acordo com Nunes (2005), todas as imunoglobulinas têm uma estrutura de quatro cadeias como unidade básica composta por duas cadeias leves idênticas (aproximadamente 25kDa) e duas cadeias pesadas idênticas (cerca de 50kDa), conforme Figura 1.

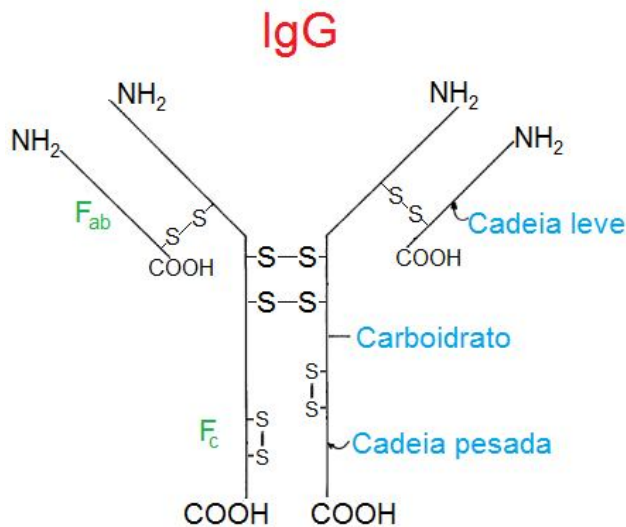


Figura 1 – Esquema ilustrativo da estrutura básica da imunoglobulina G.

Nunes (2005) explicita que as cadeias leves são comuns a todas as classes de imunoglobulinas,

enquanto que as pesadas são estruturalmente diferentes de cada classe ou subclasse e são unidas entre si por pontes de dissulfeto (-S-S-).

A imunoglobulina G representa 75% das imunoglobulinas do soro animal e tem as seguintes características e propriedades (TORTORA *et al.*, 2010):

- Predomina no sangue, linfa e líquidos cerebrospinal e peritoneal;
- Tem peso molecular de aproximadamente 150 kDa;
- Atravessa a barreira placentária em virtude da composição química de seus fragmentos Fc;
- É ativadora do sistema complemento;
- Apresenta citotoxicidade celular;
- Possui opsonização;
- É neutralizadora de toxinas, vírus e imobilizadora de bactérias;

Segundo Penha (2007), existem quatro subclasses de IgG: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, sendo a IgG1 e IgG2 identificadas por eluição na coluna de cromatografia por troca de íons. A região flexível das IgG1 e IgG2 é igual em comprimento, mas mostra divergência evolucionária. Virella e Hobbs (1971) citam que as proteínas do tipo IgG1 representam aquelas de menor mobilidade eletroforética. A IgG3 tende também a ser lenta, mas se restringe à menor faixa de mobilidade. A IgG2 e a IgG4 apresentam-se mais eletropositivas, entretanto o número de proteínas da IgG4 é insignificativo.

Segundo Capra, Tung e Nisonoff (1975) e Bazin, Beckers e Querinjean (1974), a passagem de tampão fosfato pH8,0 por uma coluna cromatográfica DEAE, contendo imunoglobulina G aderida à matriz, é responsável pela eluição da fração IgG2, cuja

mobilidade eletroforética denomina-se *fast-moving*, enquanto tampão fosfato de pH próximo a 6,1 elui IgG1, que tem mobilidade eletroforética denotada por *slow-moving*.

Tais moléculas são largamente usadas em aplicações terapêuticas, imunodiagnósticos e purificação de anticorpos e antígenos (PENHA, 2007). Para tanto, faz-se necessário o uso de IgGs de alto grau de pureza, de modo que as respostas imunológicas a antígenos aconteça de maneira específica, eficiente e sob ausência de reações cruzadas (SOUZA, 2009).

Frente à necessidade de obtenção de um produto de elevada pureza, este trabalho propôs a purificação de IgGs, a partir de soro de coelho, por precipitação e cromatografia de troca iônica e sua caracterização por meio de ensaios bioquímicos.

O método selecionado para a purificação das imunoglobulinas G apresentou-se viável devido à sua alta eficiência e baixo custo associado à coluna cromatográfica e aos ensaios bioquímicos.

Ademais, a sangria realizada para a obtenção do soro de coelho utilizado nos experimentos não é acompanhada do posterior sacrifício do animal tendo em vista a não submissão deste a quaisquer procedimentos que possam vir a alterar seu funcionamento orgânico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G

A 5,0 mL de soro de coelho (56,6 mg/mL) foram acrescentados 5,0 mL de PBS (salina fosfato tamponado). A esta solução foram adicionadas, gota a

gota, sob agitação e temperatura ambiente, frações de sulfato de amônio 100% saturado até que o volume final da solução contivesse saturação de 50%, de modo que todas as classes de imunoglobulinas precipitassem. A suspensão foi homogeneizada sob agitação magnética branda por 25 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, por 10 minutos em banho de gelo.

A mistura foi centrifugada a 14800 xG a 4°C durante 30 minutos em centrífuga Beckman J2-MC, rotor JA-20. Provenientes desta centrifugação, o sobrenadante representado por 3 na Figura 2, contendo proteínas diversas, como albumina e outras imunoglobulinas, foi reservado, e o precipitado sofreu acréscimo de 5,0 mL de PBS (volume correspondente ao original de soro). A esta, adicionou-se (gota a gota, sob agitação magnética suave em banho de gelo) 2,46 mL de sulfato de amônio 100% saturado, visando à concentração final da solução de 33% para precipitação das IgGs. A nova solução foi centrifugada a 14800 xG por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido, índice 4 da Figura 2, foi reservado, e o precipitado ressuspensionado com 5 mL de PBS e dialisado durante quatro dias contra este mesmo tampão (com trocas a cada 4 horas). A IgG purificada está representada pelo índice 5 da Figura 2.

Para a quantificação de proteínas obtidas a partir do procedimento anterior, foi usado o método físico de absorção de ondas ultravioleta em espectrofotômetro Pharmacia LKB Ultrospec III®, cuja leitura de absorbância é realizada por detecção de raios U.V. de comprimentos de onda equivalentes a 260 nm (A_{260}) e 280 nm (A_{280}), e a concentração da solução (C) é função do fator de diluição (D) e é expressa pela equação 1:

$$C = (1,55A_{280} - 0,76A_{260}) \times D \quad (1)$$

2.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE DEAE-SEPHAROSE

A coluna DEAE-Sepharose de troca iônica (9,3 x 1,5 cm; PHARMACIA BIOTEC AB, Suécia) foi equilibrada com 2 volumes de coluna de tampão fosfato 0,01 M pH 6,3 e medido em potenciômetro Digimed DMPH-2 calibrado com soluções-padrão (SIGMA-Aldrich, EUA) pH 7,00 ± 0,01 e pH 10,00 ± 0,01 (25°C). Em seguida, com IgG diluída a 1:2, neste mesmo tampão foram aplicados na coluna e eluídos com os tampões fosfato 0,01 M pH 6,3 (para purificação da IgG *slow-moving*) e 0,2 M pH 8,0 (para obtenção da IgG *fast-moving*), respectivamente.

Durante as eluições, foram coletadas frações de 2,5 mL desenvolvidas em fluxo de 1 mL/min para leitura de absorbância a 280 nm. Ambos os eluatos foram dialisados contra 2,0 L de água destilada por 72 horas, com trocas de água num intervalo de 3 em 3 horas aproximadamente.

As soluções dialisadas foram alíquotadas para posterior eletroforese (índices 6 e 7 da Figura 2) e submetidos à dosagem de proteínas por leitura de absorbância em espectrofotômetro Pharmacia LKB Ultrospec III®. Para caracterização das imunoglobulinas G obtidas, procedeu-se com eletroforese em gel SDS-PAGE 10% com e sem redução (agente redutor usado: 2-mercapto-etanol, SIGMA-Aldrich, EUA - Lote: 95H09235) da amostra de IgG, de modo a se identificar as cadeias leve e pesada da proteína.

O gel foi corado com solução de Brilliant Blue R (SIGMA-Aldrich, EUA – Lote: 068K4364) contendo 0,25% p/v deste reagente, 40% v/v de metanol e 7% de ácido acético glacial, por 1 hora sob agitação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 expressa os valores de concentração obtida das amostras por dosagem de proteínas no espectrofotômetro, os volumes e as massas calculadas.

Tabela 1

Quantidades proteicas obtidas no processo de purificação

Amostra	Concentração (mg/mL)	Volume (mL)	Massa (mg)
Soro de coelho	56,6	5,0 ± 0,0025	283
Precipitado 1*	22,7	5,0 ± 0,0025	113
Sobrenadante 1*	8	20,0 ± 0,05	160
Sobrenadante 2**	3,5	8,0 ± 0,05	28
IgG dialisada	16,39	5,0 ± 0,0025	81,95

* Precipitado e sobrenadante obtidos na precipitação com Sulfato de Amônio 50% saturado

** Sobrenadante obtido na precipitação com Sulfato de Amônio 33% saturado.

O cálculo da massa de IgG obtida na precipitação do soro de coelho permite inferir que esta correspondeu à aproximadamente 72,5% de todas as classes de

imunoglobulinas presentes no soro. Além disso, somando-se as massas relativas ao precipitado 1 e sobrenadante 1 (total de 273 mg), nota-se que esta precipitação com sulfato de amônio de saturação 50% teve eficiência de 97,5%.

Já na segunda precipitação, com saturação igual a 33%, isto é, para a obtenção de apenas imunoglobulinas G, houve eficiência de 97,3%. Tal fato foi confirmado pela eletroforese das amostras, em gel SDS-PAGE 12,5% (Figura 2), usando-se massa de amostra igual a 10 µg/canaleta e marcador de peso molecular (AMRESCO®, Brasil).

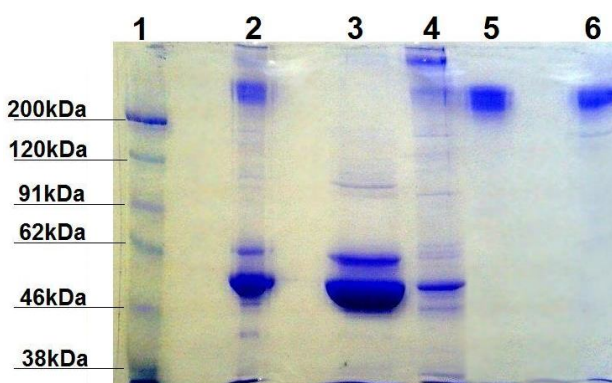


Figura 2 – Eletroforese SDS-PAGE 12,5%: Etapas de purificação de Imunoglobulina G a partir de soro de coelho

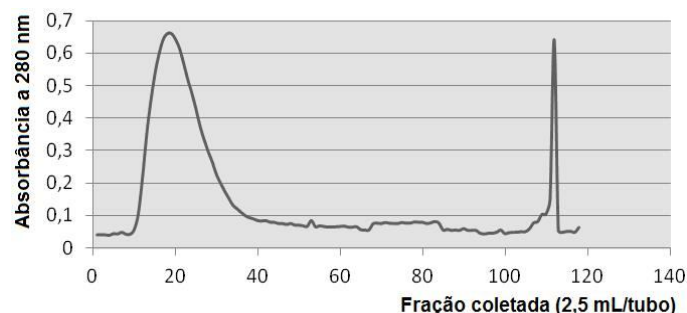
1 – Padrão de peso molecular; 2 – Soro bruto de coelho; 3 – Proteínas diversas obtidas no sobrenadante do soro de coelho precipitado com sulfato de amônio 50% saturado; 4 – Classes diversas de imunoglobulinas contidas no sobrenadante obtido a partir da precipitação com sulfato de amônio 33% saturado; 5 – IgG *slow-moving* eluída em tampão fosfato 0,01M pH6,3; 6 – IgG *fast-moving* eluída em tampão fosfato 0,01M pH8,0.

Os resultados revelados no gel mostram a eficiência da purificação, pois se observa que a amostra inicial (soro de coelho) continha inúmeras impurezas, fato notável pela quantidade e intensidade das bandas, e da mesma maneira se mostrou o sobrenadante obtido pela primeira saturação. Além disso, na amostra 4, foram reveladas várias bandas referentes a imunoglobulinas, enquanto que, após a segunda precipitação, houve somente uma banda de peso

molecular aproximado a 150 kDa na amostra 5 e também na 6, indicando a pureza das imunoglobulinas obtidas.

Obtida a imunoglobulina G pura, esta foi submetida a duas eluições na cromatografia para separação dos subtipos *slow-moving* e *fast-moving* (eluídos respectivamente em tampão fosfato 0,01 M pH 6,3 e pH 8,0). Nesta etapa, cada 2,5 mL de amostra colhida na coluna foram submetidos à leitura de absorbância a 280 nm, e o perfil cromatográfico obtido é expresso pelo gráfico 1, cujos picos representam as proteínas eluídas.

Gráfico 1 - Perfil cromatográfico da eluição das IgGs *slow-moving* e *fast-moving*



O primeiro pico representa a fração de imunoglobulina G de menor mobilidade eletroforética, enquanto o segundo é função do subtipo *fast-moving*. A absorbância máxima de ambos em aproximadamente 0,6 indica a proximidade de concentração proteica entre os subtipos eluídos da coluna, entretanto o pico mais largo revela a maior quantidade mássica do subtipo *slow-moving* na amostra de IgG inicial.

Com os subtipos de imunoglobulina G puros, selecionou-se a IgG *slow-moving* (amostra que apresentou maior grau de pureza revelado na eletroforese da Figura 2) para detecção de suas cadeias leve e pesada em eletroforese SDS-PAGE 10% (índice 2, Figura 3), já que estas caracterizam a imunoglobulina G por seus pesos moleculares característicos: duas bandas sobrepostas de aproximadamente 50 kDa relativas às cadeias

pesadas, somando 100kDa, e duas também sobrepostas de 25 kDa referentes às leves, resultando em 50 kDa. Assim, a soma desses pesos totaliza os 150 kDa da imunoglobulina G (índice 3, Figura 3).

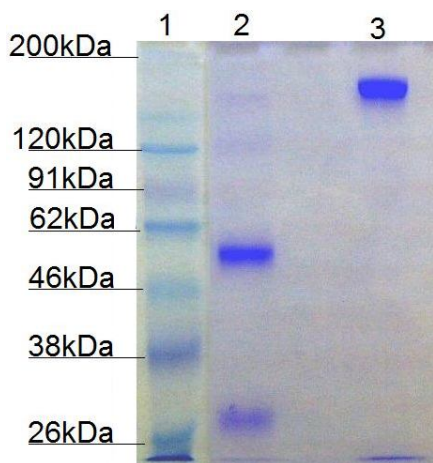


Figura 3-Eletroforeses SDS-PAGE 10%:
Caracterização de imunoglobulina G a partir da
identificação de suas cadeias leve e pesada

1 – Padrão de peso molecular; 2 – Amostra com redução de IgG slow-moving pura; 3 – Amostra sem redução de IgG slow-moving pura.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a purificação da IgG, a partir da precipitação com sulfato de amônio, seguida de cromatografia de troca iônica, mostrou-se eficiente. A IgG purificada apresentou grau de pureza elevada, sendo adequada para a indução de anticorpos específicos. Além disso, o aparecimento de banda única de 150 kDa em gel SDS-PAGE 10% para amostra sem redução, de duas bandas de 50 kDa e de duas de 25 kDa na amostra com redução caracterizam a imunoglobulina G.

REFERÊNCIAS

BAZIN, H.; BECKERS, A.; QUERINJEAN, P. **Three classes and four (sub)classes of rat immunoglobulins: IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c.** Eur. J. Immunol. 4, 44-48,1974.

CAPRA, J. D.; TUNG, A. S.; NISONOFF, A. Structure and Immunosuppression of a Cross-reactive Idiotype Associated with Anti-p-azophenylarsonate Antibodies of Strain-A Mice - **J.Immunol.**114,1548,1975.

LEFKOVITS, I. **Immunological Methods.** Academic Press, Inc. New York, EUA,1979.

NUNES, G. S. Métodos imunoquímicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estado da arte e perspectivas. **Química Nova** vol.28 nº.3. São Paulo, maio/junho de 2005.

PENHA, T. R. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais anti fragmento Fc de IgG de bovino.** Curitiba, Paraná, 2007.

SOUZA, M. C. M. **Purificação de IgG humana por cromatografia negativa em diaminas imobilizadas em gel de agarose.** Campinas, São Paulo, 2009.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia.** 10ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2010.

VIRELLA, G.; HOBBS R. J. Heavy chain typing in IgG monoclonal gammopathies with special reference to cases of serum hyperviscosity and cryoglobulinaemia. **Clin. exp. Immunol.** (1971) 9, 973-980. The National Institute for Medical Research, Mill Hill, and Westminster Hospital Medical School, London.