

OTR 11 - Desenvolvimento de estratégia de purificação de Imunoglobulina M

Hilton Jorge Nascimento¹; Renata Chagas Bastos¹; Luãna Elisa Liebscher Vidal¹; Patricia Barbosa Jurgilas¹; Priscila Muniz da Paz¹; Izabella Sodré Buty da Silva^{1*}; Alexandre Bezerra Conde Figueiredo²; Márcia Arissawa²; José Godinho da Silva Junior¹.

1 Bio-Manguinhos / FIOCRUZ, LAMAM;

2 Bio-Manguinhos / FIOCRUZ, LATAM.

Introdução:

Imunoglobulinas do tipo M são excelentes imuno marcadores para detecção de doenças na fase aguda. Neste contexto, Bio-Manguinhos produziu cinco IgM monoclonais diferentes para serem utilizados no desenvolvimento de um teste diagnóstico (em processo de patente). Via de regra, a purificação de IgM requer várias etapas, envolvendo processos de precipitação principalmente salina e métodos cromatográficos que devem ser otimizados em função da proteína alvo. As metodologias utilizadas para o isolamento e purificação de IgM influenciam diretamente a especificidade e sensibilidade de ensaios imunológicos. Neste trabalho, visamos desenvolver uma metodologia que pode ser aplicada para as diferentes IgMs produzidas, com menor tempo de execução, maior recuperação proteica e reprodutibilidade.

Objetivo:

Este estudo visa a otimização de um protocolo de purificação de IgM envolvendo, precipitação com PEG associado às cromatografias de exclusão molecular e troca iônica.

Metodologia:

Amostras obtidas a partir de diferentes clones secretores de IgM foram submetidos à precipitação com PEG-6000 à 4%. Os sobrenadantes obtidos foram incubados novamente com PEG-6000 em concentrações variando de 5 a 13% de concentração final para avaliação da cinética de precipitação de IgM. Os precipitados foram analisados por SDS-PAGE e cromatografia de exclusão molecular (SEC) em coluna Superdex 200 (10/30) para estabelecer a condição que favorece a maior concentração da IgM. Após definição da condição ideal de precipitação, o material foi submetido à SEC em coluna Superdex

200 High Load 26/60. As frações contendo IgM foram reunidas e submetidas a cromatografia de troca iônica (IEX) em coluna Poros 50HQ. A homogeneidade das frações purificadas foi analisada por SDS-PAGE.

Resultado:

A precipitação inicial com PEG 4% reduziu em 88% o teor de albumina contida nas amostras avaliadas por SDS-PAGE. Entretanto, a fração contendo IgM apresentou apenas 6,14% da área total analisada por SEC, sugerindo a necessidade de uma segunda precipitação para concentrar a fração de IgM.

Pela avaliação da cinética de precipitação subsequente observou-se que PEG na concentração final de 10% promoveu um aumento do pico de IgM de aproximadamente 5 vezes (51,72% de área total) em relação à amostra tratada com PEG 4%. Concentrações de PEG superiores a 10% promovem a precipitação de outros contaminantes que podem incluir a alfa 2 macroglobulina, principal contaminante de preparações de IgM comercial. O perfil obtido após SEC permitiu a separação de proteínas de médio a baixo peso molecular, incluindo a albumina residual. Contudo, por SDS-PAGE verificou-se a presença de contaminantes, sendo necessário uma segunda etapa cromatográfica para a purificação. A melhor condição para isolamento de IgM por IEX foi utilizando-se um gradiente do tipo degrau, no qual IgM eluiu com 0,4M de NaCl.

Conclusão:

O protocolo proposto de precipitação com PEG, SEC seguido por IEX promoveu o isolamento das imunoglobulinas tipo M produzidas em diferentes clones de forma eficiente e rápida.

Palavras-chave: IgM; Purificação; monoclonal