



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

**PURIFICAÇÃO DA GLICOPROTEÍNA G (GPV) RECOMBINANTE DO VÍRUS DA
RAIVA PRODUZIDA POR CÉLULAS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* S2
ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS
IMOBILIZADOS**

Eng^a. Paula Timoteo da Silva

Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno

Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

2007

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

Si38p Silva, Paula Timoteo da
Purificação da glicoproteína G (GPV) recombinante do vírus da raiva produzida por células de *Drosophila melanogaster* S2 através de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados / Paula Timoteo da Silva.--Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Sônia Maria Alves Bueno
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Cromatografia de afinidade. 2. Íons metálicos. 3. Quelantes. 4. Proteínas – Purificação. 5. Hidrofobia. I. Bueno, Sônia Maria Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Purification of the recombinant rabies vírus G glycoprotein (GPV) produced by *Drosophila melanogaster* S2 cells using immobilized metal íon affinity chromatography

Palavras-chave em Inglês: Rabies vírus glycoprotein, Purification, IMAC, Rabies vaccine

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Ângela Maria Moraes, Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, Ronaldo Zucatelli Mendonça

Data da defesa: 23/04/2007

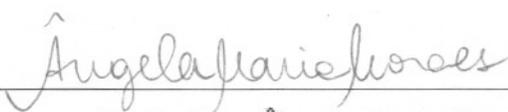
Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Paula Timoteo da Silva e aprovada em 23
de abril de 2007 pela banca examinadora constituída pelos doutores:
comissão julgadora em 23 de abril de 2007.



Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno

Orientadora – FEQ/Unicamp



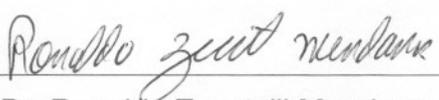
Profa. Dra. Ângela Maria Moraes

FEQ/Unicamp



Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

IB/Unicamp

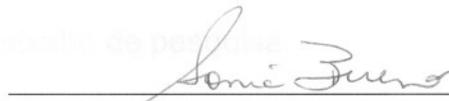


Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça

Instituto Butantan

2007 28745

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Paula Timoteo da Silva e aprovada pela comissão julgadora em 23 de abril de 2007.


Orientadora: Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno

Agradecimentos

À meus pais Gilberto Antônio da Silva e Cleuza Lúcia Timoteo da Silva e, irmãos Isabel Cristina da Silva e Edgar Matheus da Silva pelo amor, apoio e aconselhamento dados em todas as situações da vida.

À professora Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno pela orientação oferecida durante todo o trabalho de pesquisa.

Aos professores Dr^a. Wirla M. S. C. Tamashiro, Dr. Everson Alves Miranda e Dr^a. Ângela Maria Moraes pelas sugestões apresentadas no exame de qualificação e por disponibilizarem o uso de seus laboratórios.

À professora Dr^a. Ângela Maria Moraes e às doutorandas Adriana Lages Lima Galesi e Fabiana Regina Xavier Batista, do departamento de Processos Biotecnológicos da Unicamp, pelo fornecimento de amostras para a realização deste trabalho.

À professora Dr^a. Wirla M. S. C. Tamashiro e à doutoranda Ellen Heidi Costa do Instituto de Biologia da Unicamp pelo auxílio na realização de *western blotting*.

Ao professor Dr. Carlos Augusto Pereira e ao Dr. Renato Astray do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan pela realização das análises do tipo ELISA.

Aos professores e pesquisadores integrantes do projeto temático “*Expressão de genes heterólogos em células de dípteros: biologia molecular e engenharia de processos*”, Dr. Carlos Augusto Pereira (Instituto Butantan), Dr^a. Ângela Maria Moraes (Unicamp), Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo (UFSCar), Dr. Aldo Tonso (USP-Politécnica), Dr^a. Elisabeth de Fátima Pires Augusto (IPT-São Paulo), Dr. Ronaldo Z. Mendonça (Instituto Butantan), Dr^a. Wirla M. S. C. Tamashiro (Unicamp), Dr^a. Soraia Jorge (Instituto Butantan), Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno (Unicamp) e Dr. Manuel Filgueira Barral (IPT-São Paulo) pela colaboração.

Aos amigos Amaro, Ana Paula, Alessandra, Érika, Fabiana, Goran, Igor, Isa, Ivanildo, João Paulo, Leonardo, Lidiana, Lucimara, Mariana, Moysés, Oselys, Raquel, Rosana e Tashima pela ajuda, incentivo e amizade.

Ao CNPq e à FAPESP, pelo auxílio financeiro.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

Raiva ou hidrofobia é uma infecção viral que atinge o sistema nervoso central, ocorrendo em animais e humanos. As proteínas principais encontradas no vírus da raiva que atuam ativando o sistema imune são a nucleoproteína N (NPV) e a glicoproteína G, uma proteína transmembrana que forma o envelope viral e induz a produção de anticorpos neutralizantes que protegem contra o ataque viral. Este trabalho visou a purificação da glicoproteína G do vírus da raiva com cauda de polihistidina (GPV) a partir do lisado e do sobrenadante da cultura de células de inseto *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2AcGPV2), transfectadas com o vetor pAc 5.1/V5-His A contendo o gene da GPV, empregando cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). Os aspectos abordados neste trabalho foram a derivatização do gel de agarose com o agente quelante ácido iminodiacético (agarose-IDA) e a avaliação da seletividade, capacidade e reprodutibilidade do gel de agarose-IDA-Ni²⁺ na adsorção da GPV em função de diferentes sistemas tamponantes e de diferentes estratégias de dessorção de GPV (abaixamento de pH ou aumento da concentração de agente competitivo). A seletividade em cada sistema tamponante foi determinada por eletroforese SDS-PAGE das frações dos picos de proteína obtidos nas cromatografias e a quantificação de GPV presente nas frações cromatográficas foi realizada através de ensaios do tipo ELISA. A melhor condição utilizada para a purificação da glicoproteína G foi a alimentação de lisado de células em coluna contendo agarose-IDA-Ni²⁺ equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 500 mM, imidazol 2 mM pH 7,0. A lavagem foi realizada com tampão fosfato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 500 mM, imidazol 2 mM pH 6,0 e a eluição por aumento de concentração de imidazol para 200 e 500 mM. Os resultados demonstraram a potencialidade de utilização do método de IMAC para a purificação da glicoproteína G do vírus da raiva.

Palavras – chave: glicoproteína G do vírus da raiva, purificação, IMAC, vacina contra raiva.

ABSTRACT

Rabies or hydrophobia is a viral infection that affects the central nervous system, occurring in animals and humans. The main proteins found in rabies virus that activates the immunological system are the N nucleoprotein (NPV) and the G glycoprotein, a transmembrane protein that forms the spikes of the virus and induces virus-neutralizing antibodies that protect against infection. This research aimed at the purification of the rabies virus glycoprotein containing a polyhistidine tag (GPV) from lisate and supernatant of *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2AcGPV2) cells culture, transfected with the vector pAc 5.1/V5-His A containing the GPV gene, using immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). The aspects developed in this project were the agarose gel derivatization with the chelating agent iminodiacetic acid (IDA) and the evaluation of the agarose-IDA-Ni²⁺ gel selectivity, capacity and reproductibility at the GPV adsorption, regarding different buffer systems and different GPV's desorption strategies (lowering the pH of the buffer or increasing the concentration of a competitive agent in the buffer). The selectivity in each buffer system was determined by performing SDS-PAGE electrophoresis on the chromatographic samples with the larger concentration of proteins, and the GPV quantification in these samples was determined by ELISA assays. The best results of purification were found when lisate was fed into an agarose-IDA-Ni²⁺ column equilibrated with 20 mM sodium phosphate buffer containing 500 mM sodium chloride and 2 mM imidazole pH 7,0. The washing step was proceeded with 20 mM sodium phosphate buffer containing 500 mM sodium chloride and 2 mM imidazole pH 6,0 and the elution proceeded by raising the imidazole concentration at the wash buffer to 200 e 500 mM. The results demonstrated the potencial of using IMAC to purify rabies virus G glycoprotein.

keywords: rabies virus glycoprotein, purification, IMAC, rabies vaccine.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xiii
SUMÁRIO.....	xv
LISTA DE FIGURAS	xix
LISTA DE TABELAS	xxv
NOMENCLATURA	xxix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. GLICOPROTEÍNA G DO VÍRUS DA RAIVA	5
2.2. PURIFICAÇÃO DA GLICOPROTEÍNA G DO VÍRUS DA RAIVA	7
2.3. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS (IMAC)	9
2.3.1. Matriz cromatográfica	12
2.3.2. Química de coordenação	13
2.3.3. Escolha do agente quelante	14
2.3.4. Seleção do íon metálico	16
2.3.5. Mecanismos de adsorção e dessorção	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. MATERIAIS	20

3.1.1. Adsorventes	20
3.1.2. Reagentes	20
3.1.3. GPV do vírus da raiva recombinante	21
3.2. MÉTODOS	23
3.2.1. Ativação da matriz de agarose 4B com epiclorigrina	23
3.2.2. Imobilização do ácido iminodiacético (IDA)	24
3.2.3. Determinação da quantidade de íon metálico níquel imobilizado	24
3.2.4. Experimentos Cromatográficos	25
3.2.5. Quantificação de proteína total	28
3.2.6. Eletroforese SDS-PAGE “SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis”	28
3.2.7. Eletroforese nativa	29
3.2.8. Precipitação por sulfato de amônio	30
3.2.9. Quantificação da GPV por ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”)	30
3.2.10. Imunização de coelhos com vírus da raiva inativados	32
3.2.11. <i>Western Blotting</i>	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. EFEITO DO SISTEMA TAMPONANTE NA ADSORÇÃO DE GPV EM AGAROSE-IDA-NI ²⁺	35
4.1.1. Efeito do sistema tamponante e da eluição por abaixamento de pH na purificação de GPV	35

4.1.2. Efeito do sistema tamponante e da eluição com adição de agente competitivo na purificação de GPV	47
4.2. ADSORÇÃO DE GPV A PARTIR DO LISADO DE CÉLULAS EM AGAROSE-IDA-Cu ²⁺	63
4.3. CONCENTRAÇÃO DE GPV: PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO	67
4.4. ADSORÇÃO DE GPV A PARTIR DO LISADO DE CÉLULAS: COMPARAÇÃO ENTRE GEL AGAROSE-IDA-Ni ²⁺ E ADSORVENTES COMERCIAIS	70
4.4.1. Adsorção de GPV em coluna Histrap	70
4.4.2. Adsorção de GPV em agarose-Concanavalina A	75
5. CONCLUSÕES	78
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
APÊNDICE A.....	91

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Diagrama de um típico Lyssavirus (Rupprecht et al., 2002). 6
- Figura 2.2.** Diagrama do mecanismo envolvido na adsorção e dessorção de proteínas por IMAC (adaptado de Ueda et al., 2003). 10
- Figura 2.3.** Estruturas de agentes quelantes complexados aos íons metálicos. (a) IDA–Me²⁺; (b) NTA–Me²⁺; (c) CM-Asp–Me²⁺; (d) TED–Me²⁺ (adaptado de Gaberc-Porekar e Menart, 2001; Beitle e Atai, 1992). 15
- Figura 2.4.** Agentes quelantes e íons metálicos: especificidades vs. capacidade de adsorção de proteínas (adaptado de Chaga, 2001). ³. Agente quelante tridentado; ⁴. Agente quelante tetradentado; ⁵. Agente quelante pentadentado. 16
- Figura 3.1.** Sistema cromatográfico: 1. Amostra, 2. Bomba peristáltica, 3. Coluna cromatográfica, 4. Medidor de absorvância a 280 nm, 5. Coletor de frações, 6. Registrador. 25
- Figura 3.2.** Montagem para a realização da transferência. 33
- Figura 4.1.** Cromatografia de sobrenadante de cultura celular (Sf900II – lote A) (a) e do lisado de células (Sf900II – lote A) (b) no sistema tamponante MMA em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Adsorção com MMA 50 mM, NaCl 1 M pH 7,0, dessorção com MMA 50 mM, NaCl 1 M pH 4,0 e regeneração EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-5. lavagem (L), 6-8. eluição (E), 9. regeneração (R), 10. marcador de IgG humana (Aventis). Realizado em duplicata (Apêndice A). 37
- Figura 4.2.** Cromatografia de lisado de células (TC100 – lote C) no sistema tamponante MMA em agarose-IDA-Ni²⁺. Adsorção com MMA 50 mM, NaCl 1 M pH 7,0; dessorção por abaixamento de pH para 4,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Eletroforese em gel de acrilamida

10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição (E), 7-8. regeneração (R), 9. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições de amostras para a eletroforese: 2 (20X), 3/4/5 (5X), 6 (10X). 40

Figura 4.3. Cromatografia de lisado de células (TC100 – lote C) no sistema tamponante MMA em agarose-IDA-Ni²⁺. Adsorção: MMA 50 mM, NaCl 1 M pH 7,0; dessorção por abaixamento de pH para 6,0, 5,0 e 4,0, e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3. lavagem (L), 4-5. eluição 1 (E1), 6-7. eluição 2 (E2), 8. eluição 3 (E3), 9. regeneração (R), 10. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições de amostras para a eletroforese: 2 (30X), 3 (7X), 4/5 (2X), 6 (5X), 7 (3X). 41

Figura 4.4. Cromatografia de sobrenadante de cultura celular (TC100 – lote C) (a) e do lisado de células (TC100 – lote C) (b) no sistema tamponante fosfato-acetato em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação: 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Adsorção com fosfato 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0; dessorção com tampão fosfato 25 mM, NaCl 1 M pH 6,0, acetato 25 mM, NaCl 1 M pH 5,0 e 4,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7-8. eluição 2 (E2), 9. eluição 3 (E3), 10. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições na eletroforese (a): 2 (2X). Diluições na eletroforese (b): 2 (30X), 3/4 (10X), 6 (2X), 8 (2X). Realizado em duplicata (Apêndice A). 45

Figura 4.5. Cromatografia de sobrenadante de cultura celular (TC100 – lote C) no sistema tamponante fosfato-imidazol em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Equilíbrio com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 7,0; lavagem com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 6,0; dessorção com tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 200 e 500 mM pH 6,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação

(I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7-8. eluição 2 (E2), 9. regeneração (R), 10. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições de amostra para a eletroforese: 2 (2X). Realizado em duplicata (Apêndice A)..... 49

Figura 4.6. Cromatografia de lisado de células (TC100 – lote C) no sistema tamponante fosfato-imidazol em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Equilíbrio com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 7,0; lavagem com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 6,0; dessorção com tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 200 e 500 mM pH 6,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7-8. eluição 2 (E2), 9. regeneração (R), 10. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições de amostras para a eletroforese: 2(30X), 3/4 (10X), 5/6 (4X). Realizado em duplicata (Apêndice A). 50

Figura 4.7. Western Blotting. LWM: marcador de baixa massa molecular (Sigma, EUA); I: lisado de células em meio TC 100; L: Lavagem; E: eluição; S2: lisado da célula selvagem..... 53

Figura 4.8. Eletroforese nativa de frações cromatográficas obtidas com alimentação de lisado de células (TC100 – lote C) no sistema tamponante fosfato-imidazol em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Equilíbrio com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 7,0; lavagem com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 6,0; dessorção com tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 200 e 500 mM pH 6,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 7,5% (a) e 10% (b) (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7. eluição 2 (E2), 8. regeneração (R), 9. marcador de baixa massa molecular (LWM). Diluições de amostras para as eletroforeses: 2(20X), 3/4 (5X), 5 (2X)..... 54

Figura 4.9. Cromatografia de lisado de células (TC100 – lote C) no sistema tamponante em Mops-imidazol em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Adsorção MOPS 25 mM, NaCl 1 M, imidazol 2 mM pH 7,0; dessorção

com tampão MOPS 25 mM, NaCl 1 M, imidazol 200 e 500 mM pH 7,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7. eluição 2 (E2), 8. regeneração (R), 9. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições na eletroforese: 2(30X), 3/4 (10X), 5/6 (10X)..... 56

Figura 4.10. Cromatografia de lisado de células (TC100 – lote C) no sistema tamponante Tris-HCl em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Adsorção com Tris-HCl 25 mM pH 7,0; dessorção com tampão Tris-HCl a 100, 300, 500 e 700 mM pH 7,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3. lavagem (L), 4. eluição 1 (E1), 5. eluição 2 (E2), 6. eluição 3 (E3), 7. eluição 4 (E4), 8. regeneração (R), 9. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições na eletroforese: 2 (50X), 3 (20X), 8 (2X). Realizado em duplicata (Apêndice A). 59

Figura 4.11. Cromatografia de lisado de células (TC100 – lote C) no sistema tamponante fosfato-imidazol em agarose-IDA-Cu²⁺. Alimentação 3,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Equilíbrio com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 7,0; lavagem com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 6,0; dessorção com tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 200 e 500 mM pH 6,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7. eluição 2 (E2), 8. regeneração (R), 9. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições de amostras para a eletroforese: 2(20X), 3/4 (5X), 5/6 (2X)..... 64

Figura 4.12. Eletroforese do sobrenadante e precipitado, obtidos na precipitação de lisado de células em meio TC100 por adição de sulfato de amônio em diferentes concentrações (40%, 50%, 60% e 70%). Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. sobrenadante (50% lisado, 50% sulfato de amônio) (S1), 3. sobrenadante (40%

lisado, 60% sulfato de amônio) (S2), 4. sobrenadante (30% lisado, 70% sulfato de amônio) (S3), 5. sobrenadante (60% lisado, 40% sulfato de amônio) (S4), 6. precipitado (50% lisado, 50% sulfato de amônio) (P1), 7. precipitado (40% lisado, 60% sulfato de amônio) (P2), 8. precipitado (30% lisado, 70% sulfato de amônio) (P3), 9. precipitado (60% lisado, 40% sulfato de amônio) (P4), 10. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições de amostras para a eletroforese: 2(10X), 3 (5X), 4 (3X), 5 (10X), 6/7/8/9 (50X). 68

Figura 4.13. Cromatografia em coluna Histrap de lisado de cultura celular (TC 100) no sistema tamponante fosfato-imidazol. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Equilíbrio com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 7,0; lavagem com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 6,0; dessorção com tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 200 e 500 mM pH 6,0 e regeneração com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7-8. eluição 2 (E2), 9. regeneração (R), 10. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições de amostras para a eletroforese: 2(20X), 3/4 (10X). Realizado em duplicata (Apêndice A). 71

Figura 4.14. Cromatografia em coluna Histrap de lisado de cultura celular (TC 100) no sistema tamponante fosfato-imidazol. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Adsorção com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM pH 7,4 e dessorção por aumento de concentração de imidazol 100, 300 e 500 mM. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7. eluição 2 (E2), 8. eluição 3 (E3), 9. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições de amostras para a eletroforese: 2(20X), 3/4 (10X). Realizado em duplicata (Apêndice A). 72

Figura 4.15. Cromatografia de lisado de células (TC 100 – lote C) em agarose-Con A. Alimentação 3,0 mL. Vazão 0,3 mL/min. Adsorção com Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, MnCl₂ e CaCl₂ 1 mM pH 7,4 e dessorção com tampão em Tris-HCl 20

mM, NaCl 0,5 M, metil- α -D-glucopiranosídeo 0,5 M pH 7,4. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição (E), 7. regeneração (R). Diluições de amostras para a eletroforese: 2 (20x), 3 (10x), 4 (15x). 76

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1.** Balanços de massa para proteína total das cromatografias em agarose-IDA-Ni²⁺ utilizando o sistema tamponante MMA, com alimentação de sobrenadante e lisado (Sf900II). 38
- Tabela 4.2.** Concentração de GPV nas frações cromatográficas (sistema tamponante MMA) e alimentação de sobrenadante e lisado (Sf900II)..... 39
- Tabela 4.3.** Balanços de massa para proteína total de cromatografias em agarose-IDA-Ni²⁺ utilizando o sistema tamponante MMA, com alimentação de lisado (TC 100). 42
- Tabela 4.4.** Concentração de GPV nas frações cromatográficas (sistema tamponante MMA) e alimentação de lisado (TC100). 43
- Tabela 4.5.** Balanço de massa para proteína total da cromatografia de sobrenadante de cultura celular (TC100) e lisado de células (TC100) em agarose-IDA-Ni²⁺ utilizando o sistema tamponante fosfato-acetato. 46
- Tabela 4.6.** Concentração de GPV nas frações cromatográficas para sistema tamponante fosfato-acetato e injeção de sobrenadante e lisado (TC100). 47
- Tabela 4.7.** Balanço de massa para proteína total da cromatografia em agarose-IDA-Ni²⁺ utilizando o sistema no sistema tamponante fosfato-imidazol. Alimentação de sobrenadante e lisado de células (TC100). 51
- Tabela 4.8.** Concentração de GPV nas frações cromatográficas (sistema tamponante fosfato-imidazol) e alimentação de sobrenadante e lisado (TC100).. 52
- Tabela 4.9.** Balanço de massa para proteína total da cromatografia de lisado de células (TC100) em agarose-IDA-Ni²⁺ utilizando o sistema no MOPS-imidazol.... 57
- Tabela 4.10.** Concentração de GPV nas frações cromatográficas para o sistema tamponante MOPS-imidazol e alimentação de lisado (TC100). 57

- Tabela 4.11.** Balanço de massa para proteína total da cromatografia de lisado de células (TC100) em agarose-IDA-Ni²⁺ utilizando o sistema tamponante Tris-HCl. 60
- Tabela 4.12.** Concentração de GPV nas frações cromatográficas para o sistema tamponante Tris-HCl e alimentação de lisado (TC100)..... 61
- Tabela 4.13.** Concentração de GPV nas frações cromatográficas para o sistema tamponante MMA com alimentação de sobrenadante (S) e lisado (L) (Sf900II – lote A) e lisado (L) (TC100 – lote C), e para o sistema tamponante fosfato-acetato com alimentação de lisado (L) (TC100-lote C)..... 62
- Tabela 4.14.** Concentração de GPV nas frações cromatográficas para o sistema tamponante fosfato-imidazol com alimentação de sobrenadante (S) e lisado (L) (TC100 – lote C), para o sistema tamponante Tris-HCl e MOPS-imidazol com alimentação de lisado (L) (TC100-lote C)..... 63
- Tabela 4.15.** Balanço de massa para proteína total da cromatografia em agarose-IDA-Cu²⁺ utilizando o sistema tamponante fosfato-imidazol. Alimentação de lisado de células (TC100)..... 65
- Tabela 4.16.** Concentração de GPV nas frações cromatográficas para o sistema tamponante fosfato-imidazol e alimentação de lisado (TC100)..... 66
- Tabela 4.17.** Concentração de GPV nas amostras de sobrenadante e precipitado obtidas na precipitação de lisado (TC100) com sulfato de amônio. 69
- Tabela 4.18.** Balanço de massa para proteína total da cromatografia em coluna Histrap. Alimentação de lisado de células (TC100)..... 73
- Tabela 4.19.** Concentração de GPV nas frações cromatográficas do lisado de células (TC100) em coluna Histrap. 74
- Tabela 4.20.** Balanço de massa para proteína total da cromatografia em agarose-Con A com alimentação de lisado de células (TC 100)..... 76

Tabela 4.21. Concentração de GPV nas frações cromatográficas do lisado de células (TC 100) em agarose-Con A.....	77
---	----

NOMENCLATURA

Agarose-Con A: Gel de agarose contendo a lectina concanavalina A imobilizada;

Agarose-IDA: Gel de agarose ativado com epícloridrina contendo o agente quelante IDA imobilizado;

BSA: *Bovine Serum Albumin* (albumina do soro bovino);

CM-Asp: Ácido aspártico carboximetilado;

Con A: Concanavalina A;

DEAE-celulose: dietilaminoetil-celulose;

DEAE-sepharose: dietilaminoetil-agarose;

EDTA: Ácido etilenodiamino tetracético;

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ensaio imunoabsorvente ligado à enzima);

GPV: Glicoproteína G do vírus da raiva;

IDA: Ácido iminodiacético;

IMAC: *Immobilized metal ion affinity chromatography* (Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados);

MDBK: *Madin Darby bovine Kidney* (rim de bovino Madin Darby);

MES: Ácido 2-morfolinoetano sulfônico;

MMA: MES, MOPS e acetato;

MOPS: Ácido 3-N-morfolinopropanosulfônico;

NTA: Ácido nitrilotriacético;

PBS : *Phosphate Buffered Saline* (fosfato salino tamponado);

RNA: *Ribonucleic acid* (ácido ribonucléico);

S2AcGPV2: Células de inseto *Drosophila melanogaster* Schneider 2 transfectadas com o vetor pAc 5.1/V5-His A;

SDS: Dodecil sulfato de sódio;

SDS-PAGE: *SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (Eletroforese SDS em gel de poliacrilamida);

TED: Tris-carboximetil etilenodiamina;

TEMED: N, N, N', N'-tetra-metilenodiamina;

Tris: Tris(hidroximetil)-aminometano;

VHSV: Viral haemorrhagic septicaemia vírus (vírus da septicemia hemorrágica viral);

1. INTRODUÇÃO

Os avanços científicos na área de biotecnologia vêm possibilitando a produção em grande escala de proteínas e peptídeos utilizados na indústria farmacêutica e na obtenção de vacinas. Entre os produtos virais de interesse, com relação à produção de imunobiológicos, encontra-se a glicoproteína G do vírus da raiva, proteína constituinte da vacina contra a raiva que confere proteção imunológica.

O vírus da raiva, membro do gênero *Lyssavirus*, da família *Rhabdoviridae*, possui uma única fita simples de RNA não segmentada e causa uma forma fatal de encefalomielite que constantemente produz vítimas em seres humanos e em animais domésticos ou selvagens (Gupta et al., 2005). A doença é transmitida através da mordida de um animal infectado, geralmente de um cão, e pode ser prevenida através da administração oportuna de vacina pós-mordedura (Nagarajan et al., 2006).

O vírus se transmite da região da mordedura até o cérebro, causando sintomas como convulsões, exaustão ou paralisia, sendo a morte inevitável. A raiva é particularmente predominante em países em desenvolvimento da Ásia e África, onde se estima 55000 mortes humanas por ano causadas pela doença (World Health Organization, 2004). Cães e gatos infectados estão envolvidos em cerca de 99% dos casos humanos e, em vista disto, o meio mais efetivo de reduzir a incidência da raiva em seres humanos é prevenir a doença em animais através da vacinação (Drings et al., 1999).

Cinco proteínas estruturais, chamadas nucleoproteína, fosfoproteína, proteína matriz, glicoproteína e RNA polimerase dependente de RNA, são codificadas pelo genoma viral de 12 kbp. A glicoproteína do vírus da raiva, única proteína exposta na superfície da partícula viral, é o mediador da ligação aos receptores celulares e da entrada em células hospedeiras. A estrutura da glicoproteína, proteína transmembrana tipo I, consiste em um domínio citoplasmático, um domínio transmembrana, e um ectodomínio (domínio extracelular) exposto como trímero na superfície do vírus. O ectodomínio está

envolvido na indução da produção de anticorpos neutralizantes, que protegem contra a infecção viral, e na proteção pré ou pós-exposição à vacinação (Gupta et al., 2005).

Atualmente a raiva tem sido praticamente erradicada no Brasil, mas o número de morcegos infectados pelo vírus rábico cresceu significativamente no estado de São Paulo, e conseqüentemente, vários eqüinos e bovinos têm sido infectados, vítimas da mordedura dos morcegos. Portanto, torna-se preocupante o estudo de vacinas mais baratas e eficazes contra a raiva, uma vez que em alguns países da América Latina ainda se utiliza a vacina anti-rábica Fuenzalida & Palácios, constituída de vírus inativados produzidos em cérebro de camundongos recém-nascidos (Díaz et al., 1989).

Na última década, células de inseto foram utilizadas na expressão de proteínas recombinantes e na produção de baculovírus empregados como biopesticidas. As células embrionárias de dípteros como a *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2), por exemplo, podem ser utilizadas na expressão de proteínas heterólogas como a dopamina β -hidroxilase humana (Li et al., 1996), a glicoproteína 120 do envelope do HIV (Culp et al., 1991) e o receptor de glucagon humano (Tota et al., 1995), dentre outras. Estas células podem ser cultivadas com menores custos quando comparadas às células de mamíferos, devido à possibilidade de obtenção de elevadas densidades celulares em temperatura ambiente e em condições atmosféricas e, com exceção de N-glicosilação, executam as modificações pós-tradução similares às células de mamíferos (Benting et al., 2000).

Devido às vantagens apresentadas pela célula de inseto, Yokomizo et al. (2007) estabeleceram um sistema de expressão gênica da glicoproteína do vírus da raiva (S2AcGPV2) em células de *Drosophila melanogaster* Schneider S2, transfectadas com o vetor pAc 5.1/V5-His A contendo o gene da GPV, e Batista et al. (2005), assim como Galesi et al. (2006), têm estudado formulações de meios de cultivo para as células transfectadas com o vetor de expressão. Yokomizo et al. (2007) verificaram a habilidade desta proteína recombinante expressa induzir a síntese de anticorpos e proteger contra a infecção com o vírus da raiva. Para isso,

realizaram a imunização de camundongos com 114 ng da glicoproteína recombinante que protegeu 80% dos animais.

A purificação de proteínas recombinantes pode ser facilitada incorporando-se uma cauda (proteína ou peptídeo) na porção N ou C terminal da proteína, uma vez que a cauda (proteína ou seqüência particular de aminoácidos) pode ser especificamente reconhecida por um anticorpo ou ligante imobilizado em uma matriz cromatográfica (Wojczyk et al., 1996). O aminoácido histidina forma complexos estáveis com quelatos metálicos e, portanto, a presença de uma cauda com seis resíduos de histidina acoplada à GPV facilita a purificação desta proteína por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) (Porath et al., 1975; Sulkowski, 1985; Arnold, 1991; Clemmitt e Chase, 2000).

Apesar da incorporação de caudas proporcionar maior seletividade na purificação de proteínas, dificilmente a purificação pode ser realizada em uma única etapa. No caso da GPV, a separação sólido-líquido (separação das células do meio de cultivo e a lise celular) é sempre requerida e, normalmente, após a separação sólido-líquido, são necessárias etapas de ultrafiltração e de precipitação para eliminação de impurezas antes da alimentação da solução protéica na coluna cromatográfica.

A vacina anti-rábica pode ser produzida utilizando-se vírus inativados produzidos a partir de cultivos celulares ou tecido nervoso, que pode causar encefalomielite aos pacientes, sendo, portanto, necessário garantir a ausência de vírus ativo na vacina produzida (World Health Organization, 2004). Por isso, estuda-se a produção de vacinas contendo a glicoproteína G do vírus da raiva livre da superfície viral. Perez et al. (1998), com o intuito de purificar a glicoproteína G do vírus da raiva que infecta peixes, utilizaram cromatografia de afinidade com lectina (Concanavalina A) imobilizada para purificação da GPV, explorando a afinidade das glicoproteínas (GPV) por lectinas imobilizadas. Porém, não há na literatura consultada registros de artigos publicados sobre o estudo da purificação da GPV recombinante empregando-se a técnica de IMAC, o que torna relevante o desenvolvimento do processo de recuperação e purificação da GPV utilizando esta técnica.

Em vista disso, o objetivo desta dissertação de mestrado, inserido no projeto temático FAPESP intitulado: “Expressão de genes heterólogos em células de dípteros: biologia molecular e engenharia de processos”, foi investigar o potencial de utilização da técnica de cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC) para a purificação da GPV recombinante a partir do sobrenadante de cultura celular e do lisado de células de *Drosophila melanogaster* Schneider S2 transfectadas com o vetor pAc 5.1/V5-His A contendo o gene da GPV.

Para atingir o objetivo proposto, a técnica de IMAC em gel agarose-IDA-Me²⁺ (matriz sintetizada em nosso laboratório, LIMBio, UNICAMP) foi empregada para purificação da GPV recombinante em uma única etapa, uma vez que esta proteína possui possivelmente uma cauda de polihistidina. Os resultados obtidos foram comparados com cromatografias em coluna de IMAC comercializada pela Amersham Biosciences e cromatografia de afinidade com lectina imobilizada (agarose – Concanavalina A comercializada pela Sigma).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. GLICOPROTEÍNA G DO VÍRUS DA RAIVA

A raiva é uma encefalite progressiva aguda, causada por vírus do gênero *Lyssavirus*, pertencente à família *Rhabdoviridae*. A doença é uma das principais zoonoses de preocupação da saúde pública em muitas partes do mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, onde é endêmica entre os cães (Rath et al., 2005). Dos seis vírus relacionados à raiva já identificados (vírus rábico, vírus Lagos de morcegos, Mokola, Duvenhage, vírus europeu de morcego 1 e 2) todos, com exceção do Lagos, podem transmitir a doença para humanos (Smith, 1996). A mordida de um animal infectado pode transmitir a raiva e, portanto, a aplicação de vacina é uma maneira de prevenção da doença (Nagarajan et al., 2006). Diversos países continuam a produzir vacinas contra o vírus da raiva derivadas de tecido de cérebro animais, que é pouco potente e pode produzir sérios efeitos adversos em humanos, incluindo encefalomielite alérgica (Rupprecht et al., 2002).

O vírus da raiva (Figura 2.1), de comprimento de 180 nm e diâmetro de 75 nm (Sato et al., 2004), é um envelope viral que entra na célula por um processo de endocitose mediante receptor. Esta etapa é seguida pela fusão entre as membranas virais e endosomais que permite a liberação do genoma de RNA negativo no citoplasma (Maillard et al., 2003). O reconhecimento do receptor (Wunner et al., 1984; Thoulouze et al., 1998; Tuffereau et al., 1998) e a fusão da membrana induzida por baixo pH (Gaudin, 1997) são mediados pela glicoproteína G, uma glicoproteína viral transmembrana.

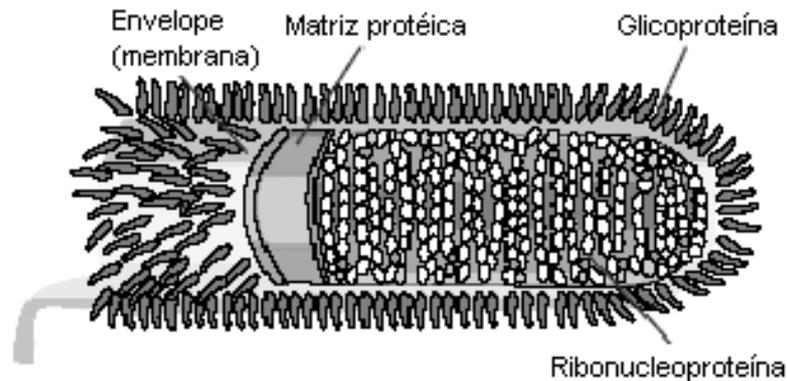


Figura 2.1. Diagrama de um típico Lyssavirus (Rupprecht et al., 2002).

Todos os vírus envelopados iniciam a infecção por fusão de membrana entre o vírus e a célula de interesse, um processo mediado por uma proteína de fusão viral (Cleverley e Lenard, 1998). Segundo Da Poian et al. (2005), as glicoproteínas de fusão viral compartilham de uma série de características em comum:

1. São proteínas de membrana integral do tipo I, apresentando um grande ectodomínio, uma seqüência transmembrana única e um final C-terminal pequeno dentro da membrana viral;
2. Possuem uma seqüência sinal N-terminal que é clivada depois de direcionar a proteína ao retículo endoplasmático;
3. Possuem carboidratos N-terminais;
4. Formam oligômeros e ocorrem em altas densidades na membrana viral;
5. Possuem um segmento específico envolvido na fusão da membrana conhecido como o peptídeo de fusão.

As proteínas de fusão do tipo I, que inclui as glicoproteínas, formam estruturas oligoméricas na forma trimérica geradas pela clivagem de uma proteína

precursora. Além disso, nesse tipo de proteína o final C-terminal é ancorado à membrana viral e o N-terminal consiste em um segmento hidrofóbico contendo aproximadamente 20 aminoácidos. As proteínas de fusão do tipo II, no entanto, formam estruturas oligoméricas na forma de dímeros e o peptídeo de fusão é uma associação interna entre duas folhas β (Da Poian et al., 2005).

Dentre as proteínas encontradas no vírus da raiva, as principais que atuam ativando o sistema imune são a glicoproteína G (GPV) e a nucleoproteína N (NPV). A GPV é uma glicoproteína transmembrana do tipo I, organizada na forma trimérica (3 X 65 kDa) (Gaudin et al., 1992), forma saliências a 8,3 nm da membrana viral (Maillard e Gaudin, 2002) e induz a produção de anticorpos neutralizantes que protegem contra o ataque viral (Desmézières et al., 2003). A NPV, por outro lado, se liga ao RNA viral e à proteínas, formando complexos ribonucleoprotéicos (Sokol et al., 1969).

A proteína trimérica é composta de monômeros de GPV associados não covalentemente que são constituídos de mais de 500 aminoácidos, de 2 a 6 potenciais sítios de glicosilação, de 12 a 16 resíduos de cisteínas, de 2 a 3 regiões hidrofóbicas hepta-repetidas a-d, que consiste em uma seqüência de sete resíduos de aminoácidos que ocorre repetidamente na proteína, da ausência de peptídeo sinal hidrofóbico no terminal amino e de uma seqüência hidrofóbica transmembrana próxima do C-terminal, seguida por um curto domínio citoplasmático (Coll, 1995).

2.2. PURIFICAÇÃO DA GLICOPROTEÍNA G DO VÍRUS DA RAIVA

Na atualidade existe uma grande necessidade de produzir vacinas anti-rábicas na qualidade requerida, em grande escala e de uma forma econômica, principalmente nos países em que esta doença é endêmica (Kumar et al., 2005). Quatro tipos de vacinas, obtidas a partir de diferentes substratos, são produzidas por multiplicação viral, entre elas: vacinas a partir de tecido nervoso (NTV), vacinas embrionárias, vacinas de DNA e vacinas de culturas celulares, que são eficazes e bem toleradas (Kumar et al., 2005; Dreesen, 1997; Diogo et al., 2001).

Para a produção de vacinas anti-rábicas para aplicação em seres humanos, preparadas a partir de suspensões contendo o vírus da raiva obtidas através de células Vero infectadas e cultivadas em meio livre de soro, Frazatti-Gallina et al. (2004) purificaram a suspensão viral por cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-celulose (Sigma, EUA), retirando-se resíduos de DNA celular dessa suspensão viral, como recomendado pelo WHO (World Health Organization), que foi então inativada com β -propilactona (1:4000). A vacina obtida por esta metodologia teve uma potência de 8,0 IU (International Units) por dose.

Com o intuito de desenvolver um método simples de adsorção de antígeno viral, para obtenção de uma vacina anti-rábica purificada, Kumar et al. (2005), utilizaram um gel de DEAE-sepharose CL-6B (Pharmacia, Suécia) para a purificação do antígeno, separando-o de resíduos de DNA e de proteínas do soro animal resultantes em vacinas produzidas em células Vero. Os autores produziram uma vacina viral purificada com potência de 9,42 IU/mL.

Devido à possibilidade de reações adversas causadas pelas vacinas com vírus inativados, tem-se estudado a produção destas contendo a glicoproteína G do vírus da raiva livre, proteína presente na superfície viral, que induz a produção de anticorpos e protege contra a infecção (Perez et al., 1998).

Perez et al. (1998), descreveram uma técnica para purificação, em uma única etapa, da glicoproteína G do vírus da raiva, composta de 507 aminoácidos, com monômeros de massa molecular de 50 kDa, que infecta peixes (VHSV – *Viral haemorrhagic septicaemia virus*). Devido ao fato da lectina concanavalina A (Con A), das lectinas do gérmen de trigo e da ervilha aglutinarem o VHSV, os autores realizaram a purificação da glicoproteína por cromatografia de afinidade utilizando a lectina Con A como ligante imobilizado. A proteína foi isolada do vírus concentrado por detergentes e do sobrenadante de células infectadas com VHSV, atingindo-se uma pureza maior que 85%.

Em 2005, Gupta et al. estudaram a expressão da glicoproteína da raiva com cauda de polihistidina na forma solúvel utilizando uma linhagem estável de células eucarióticas transfectadas e purificaram esta proteína recombinante, solúvel em sobrenadante de cultura de células MDBK (*Madin Darby bovine*

Kidney) por cromatografia de afinidade em coluna de agarose-Ni²⁺, obtendo um rendimento de 3 mg de proteína purificada por 100 mL de sobrenadante de cultura celular.

Desta forma, devido aos poucos trabalhos encontrados abordando técnicas de purificação que permitam a obtenção da glicoproteína G do vírus da raiva na pureza requerida e preservando sua estrutura nativa, torna-se relevante o estudo da purificação desta proteína por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC).

2.3. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS (IMAC)

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), introduzida em 1975 por Porath et al., explora a afinidade entre íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida e grupamentos situados na superfície de uma determinada proteína (Sulkowski, 1985) e tem sido bastante utilizada na purificação de proteínas nativas ou recombinantes, peptídeos e ácidos nucleicos, por apresentar alta especificidade, capacidade e estabilidade, baixo custo, dessorção em condições brandas e facilidade de ampliação de escala (Vijayalakshmi, 1989; Hochuli, 1988).

Segundo Porath et al. (1975), na presença de íons metálicos imobilizados, alta concentração de sal e determinadas condições de pH, os resíduos dos aminoácidos histidina, cisteína e triptofano presentes na superfície da proteína são fortemente adsorvidos devido às ligações de coordenação formadas entre os íons metálicos e os grupos doadores de elétrons (anel imidazol, grupo tiol e grupo indol, respectivamente). Estudos revelaram que a retenção de proteínas em IMAC é largamente governada pela exposição de resíduos de histidina na superfície da proteína, apesar de cisteína e triptofano também possuírem forte afinidade por metais (Ueda et al., 2003). Segundo Arnold (1991), apesar das cisteínas livres possuírem potencial para interação com o metal quelatado, na prática elas

raramente estão disponíveis no estado reduzido apropriado, existindo, então, dificuldades para manter os resíduos de cisteína acessíveis para coordenação.

Em IMAC, a coluna cromatográfica é composta de uma matriz à qual o agente quelante é covalentemente imobilizado via um espaçador. Quando os íons metálicos são adicionados, os quelantes multidentados e os íons metálicos formam complexos (quelatos), em que os íons metálicos estarão fixos para subsequente interação entre os sítios de coordenação livres e as moléculas a serem purificadas (Figura 2.2).

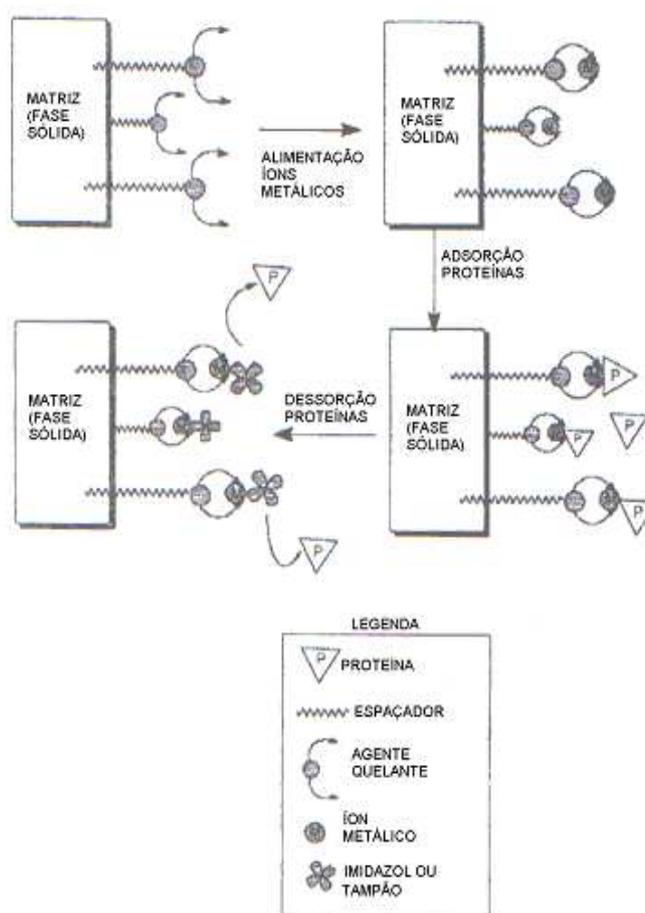


Figura 2.2. Diagrama do mecanismo envolvido na adsorção e dessorção de proteínas por IMAC (adaptado de Ueda et al., 2003).

Os íons metálicos quelatados (ou complexados) devem possuir sítios de coordenação livres para que as moléculas de solvente ou soluto possam se ligar a

eles. A força de ligação entre metal-proteína varia de proteína para proteína e, em muitos casos, essa diferença pode ser explorada para aumentar a eficiência de separação e o isolamento de proteínas específicas (Ueda et al, 2003). Se muitos sítios são ocupados pelos elétrons do agente quelante, poucos sítios permanecem disponíveis para a ligação com a proteína e a mesma é adsorvida mais fracamente. Este fenômeno ocorre quando TED (tris-carboximetil etilenodiamina) é utilizado como agente quelante (Gaberc-Porekar e Menart, 2001), pois TED-Me⁺² pode, em princípio, formar somente um complexo com peptídeos e proteínas, enquanto que o ácido iminodiacético, IDA, agente quelante mais comumente utilizado em IMAC, pode formar um quelato metálico (Sulkowski, 1985).

Nas últimas décadas, IMAC tem emergido como uma ferramenta laboratorial essencial para o isolamento e purificação de proteínas, especialmente de proteínas recombinantes, e está começando a ser encontrada em aplicações industriais (Sharma e Agarwal, 2002), como por exemplo, em etapas de purificação no processo de produção de pró-insulina (Tikhonov et al., 2001).

De acordo com Wong et al. (1991), a técnica de IMAC possui muitas vantagens em relação aos métodos típicos de cromatografia de afinidade, como por exemplo:

1. Diferentes metais podem ser imobilizados no quelante e podem ser facilmente removidos através da adição de fortes agentes competidores sem que haja perda da capacidade da matriz;
2. O adsorvente contendo o agente quelante é estável, proporcionando perdas mínimas das propriedades ligantes dos metais;
3. A escolha adequada do metal e das condições de eluição proporciona a purificação de diferentes proteínas;
4. Na maioria dos casos, as proteínas mantêm a atividade biológica após sua eluição.

A purificação por IMAC, portanto, depende de diversos fatores, como a escolha da matriz, do agente quelante, do íon metálico e da determinação das condições ótimas de adsorção e dessorção para que a interação proteína-metal seja favorecida e resulte em uma alta recuperação e seletividade da proteína alvo.

2.3.1. Matriz cromatográfica

Existe uma variedade de suportes que podem ser utilizados em cromatografia de afinidade. A escolha da matriz a ser utilizada é importante, pois pode ter um efeito considerável na estabilidade do complexo formado entre o metal imobilizado e a proteína.

As propriedades geralmente requeridas para um suporte cromatográfico são a fácil derivatização, características hidrofílicas para diminuir interações não específicas, a uniformidade no tamanho das partículas, formato para um bom empacotamento da coluna, área superficial suficiente para altas capacidades, estabilidade mecânica e resistência a ataques de microorganismos. Suportes com tamanho de partícula pequeno têm alta resistência à vazão e podem causar elevação da pressão na coluna e obstruí-la. Suportes com tamanho de partícula grande reduzem a resistência à vazão, mas reduzem também a eficiência da coluna, uma vez que a área de contato para a adsorção diminui, e suportes com partículas irregulares podem resultar em empacotamento não uniforme (Wong et al., 1991).

Em IMAC podem ser utilizados diversos materiais como suporte: materiais inorgânicos (sílica, vidro poroso e cerâmica), polímeros orgânicos naturais (agarose, dextrana e celulose) ou polímeros sintéticos (poliacrilamida, derivados de ácido acrílico e metacrílico). A agarose, um polissacarídeo linear e solúvel em água, é largamente utilizada como suporte em IMAC, pois é uma matriz hidrofílica, mecânica e quimicamente estável, e relativamente inerte (Wong et al., 1991).

2.3.2. Química de coordenação

Em IMAC, a adsorção de proteínas é baseada na coordenação entre os metais imobilizados e os grupos doadores de elétrons da superfície da proteína. Os metais mais comumente utilizados são os íons de metais de transição como Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , que são receptores de pares de elétrons e podem ser considerados ácidos de Lewis (Gaberc-Porekar e Menart, 2001). Os átomos doadores de elétrons (N, S e O), presentes nos compostos quelantes e imobilizados no suporte cromatográfico, são capazes de se ligar por coordenação aos metais formando quelatos metálicos, que podem ser bi, tri, tetra ou pentadentados, dependendo do número sítios de coordenação ocupados. Os sítios de coordenação metálicos que permanecem livres são normalmente ocupados com moléculas de água que podem ser trocadas com grupos doadores de elétrons disponíveis da proteína (Gaberc-Porekar e Menart, 2001). Quando uma molécula de proteína que possui grupos doadores de elétrons (histidina, cisteína e triptofano) acessíveis em sua superfície é inserida, em pH neutro, em uma coluna cromatográfica contendo íons metálicos imobilizados (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), a ligação de coordenação é estabelecida resultando na retenção da proteína (Sulkowski, 1989) e possibilitando sua purificação.

O princípio de Ácidos e Bases Fortes e Fracos (HSAB – *Hard and Soft Acids and Bases*) assume que na ligação de dois átomos, um atua como ácido de Lewis e o outro como base de Lewis. Átomos como oxigênio, nitrogênio alifático e fósforo são classificados como bases fortes, enquanto o nitrogênio aromático é classificado como base intermediária e o enxofre como base fraca. Os cátions monovalentes (Ag^+ , Au^+ , Hg^+ , Cu^+) são os ácidos fracos, enquanto K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{3+} são ácidos fortes e os íons metálicos Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} ácidos intermediários. De acordo com o HSAB, os ácidos fortes formam ligações estáveis com as bases fortes e, os ácidos fracos com as bases fracas (Wong et al., 1991). Portanto, os íons metálicos fortes Fe^{3+} , Ca^{2+} e Al^{3+} formam ligações mais estáveis com átomos de oxigênio, enquanto os íons metálicos fracos Cu^+ , Hg^{2+} e Ag^+ coordenam preferencialmente com enxofre e os intermediários Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e

Co^{2+} com nitrogênio, mas também com oxigênio e enxofre (Porath, 1988; Chaga, 2001).

Em soluções aquosas, nas quais os íons metálicos são solvatados por moléculas de água, o íon metálico atua como ácido de Lewis e a água como base de Lewis. Quando a água é substituída por uma base forte, um complexo de coordenação é formado. O quelato, no entanto, é formado quando dois ou mais átomos de uma mesma molécula coordenam com um único metal que possui vários pares de elétrons (Porath et al., 1975; Sulkowski, 1985; Wong et al., 1991). A geometria de coordenação octaédrica é alcançada quando o íon metálico forma um híbrido sp^3d^2 com os doadores de elétrons, onde cada doador ocupa um dos vértices que circundam o metal (Beitle e Atai, 1992).

Segundo Porath et al. (1975) e Sulkowski (1985), o anel imidazol da histidina é responsável pela ligação da proteína aos íons metálicos Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} quelatados, devido à coordenação entre o par de elétrons presentes no nitrogênio do anel e o íon metálico. Desta maneira, tem-se estudado, em diversos trabalhos, a incorporação de caudas de polihistidina na proteína de interesse, conferindo a possibilidade de sua purificação através de IMAC (Chaga et al., 1999).

2.3.3. Escolha do agente quelante

O número de ligações formadas entre o íon metálico e o quelante imobilizado determina a afinidade total do adsorvente pelas proteínas. Todos os sítios de coordenação disponíveis do metal que estão sendo ocupados por interações aniônicas fracas ou por moléculas de solventes são os centros de adsorção efetivos do gel, sendo, portanto, importante a escolha do agente quelante. Quanto mais forte a imobilização do metal, mais fraca será a interação com a proteína (Porath, 1988).

Dentre os compostos utilizados como agentes quelantes em IMAC, como o ácido nitrilotriacético (NTA), o ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp) e o tris-carboximetil etileno diamina (TED), o ácido iminodiacético (IDA) é o mais utilizado

(Chaga, 2001). No tridentado IDA, o metal se liga ao átomo de nitrogênio e a dois oxigênios, deixando três sítios livres para interação com as proteínas (Ueda et al., 2003). De acordo com Sulkowski (1989), no caso do agente quelante IDA, a força de retenção depende do metal envolvido na coordenação, sendo maior quando os íons imobilizados são Cu^{2+} ou Ni^{2+} , e menor quando são Zn^{2+} ou Co^{2+} .

Os agentes quelantes tetradentados como NTA e o CM-Asp ocupam quatro sítios de coordenação, três ocupados por átomos de oxigênio e um pelo átomo de nitrogênio, proporcionando maior afinidade com os íons metálicos que o IDA, mas deixando livres apenas dois sítios de coordenação no caso de imobilização de metais hexacoordenados. Isso é mais pronunciado para o TED, agente quelante pentadentado que possui três sítios ocupados por átomos de oxigênio e dois por átomos de nitrogênio, deixando livre apenas um sítio de coordenação livre para interação com as proteínas (Gaberc-Porekar e Menart, 2001). A Figura 2.3 apresenta as estruturas de alguns agentes quelantes complexados aos íons metálicos.

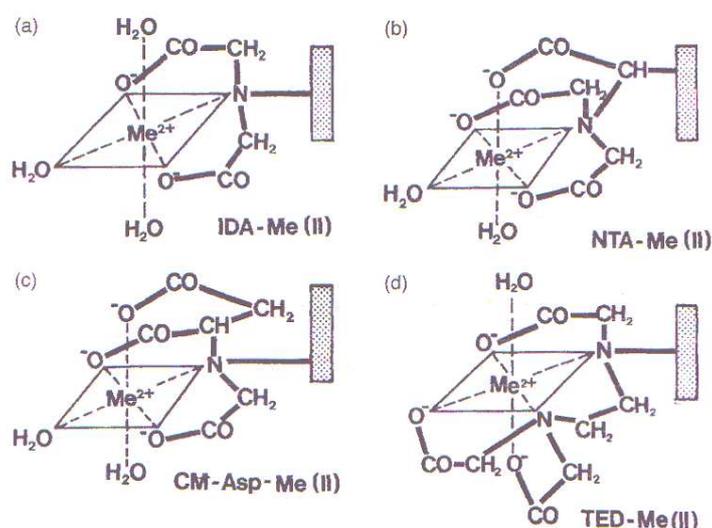


Figura 2.3. Estruturas de agentes quelantes complexados aos íons metálicos. (a) IDA– Me^{2+} ; (b) NTA– Me^{2+} ; (c) CM-Asp– Me^{2+} ; (d) TED– Me^{2+} (adaptado de Gaberc-Porekar e Menart, 2001; Beitle e Ataii, 1992).

A Figura 2.4 é uma representação simplificada da capacidade de adsorção e seletividade em função de vários agentes quelantes e íons metálicos, mostrando que o íon Cu^{2+} , por exemplo, possui uma maior capacidade de adsorção de proteínas, porém menor seletividade e o agente quelante TED, uma menor capacidade de adsorção, proporcionando, porém, uma melhor seletividade na purificação. Portanto, para escolher o sistema mais adequado para a purificação de uma determinada proteína, é necessário conhecer as características da proteína e as propriedades dos agentes quelantes e dos íons metálicos imobilizados.

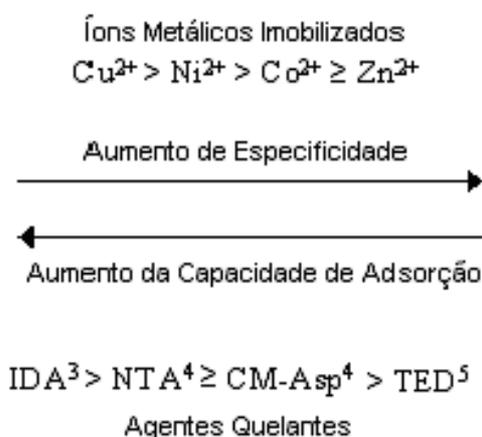


Figura 2.4. Agentes quelantes e íons metálicos: especificidades vs. capacidade de adsorção de proteínas (adaptado de Chaga, 2001). ³ Agente quelante tridentado; ⁴ Agente quelante tetradentado; ⁵ Agente quelante pentadentado.

2.3.4. Seleção do íon metálico

Em princípio, todos os metais suscetíveis de interagir com proteínas podem ser utilizados em IMAC. No entanto, Fe^{+3} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Al^{+3} e Ca^{+2} são os íons metálicos mais freqüentemente utilizados. Os íons Cu^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} apresentam interação com resíduos de histidina, triptofano e cisteína, enquanto que os íons Fe^{+3} e Al^{+3} ligam-se a grupamentos fosfato e fosfoésteres primários, oferecendo, desta forma, a possibilidade de serem utilizados para separar fosfoproteínas (Andersson e Porath, 1986; Sulkowski, 1989). O íon Ca^{+2} coordena o átomo de oxigênio presente no grupo carboxílico dos resíduos de

glutamato e aspartato da molécula e pode ser utilizado, portanto, para purificar proteínas que contenham vários grupamentos carboxílicos próximos (Wong et al., 1991).

Em IMAC, a retenção depende do número e tipo de grupos de aminoácidos que podem interagir com o metal, sendo influenciada por variáveis independentes tais como pH, temperatura, tipo de solvente, tipo e concentração do sal, natureza do metal imobilizado, densidade de ligantes e tamanho da proteína (Wong et al., 1991). A análise da retenção de peptídeos e proteínas em géis de IDA-Cu⁺², IDA-Ni⁺², IDA-Zn⁺² e IDA-Co⁺² mostrou forte afinidade desses géis pelos resíduos histidina acessíveis presentes nessas proteínas e peptídeos. Sulkowski, em 1989, estabeleceu as seguintes regras que, em presença de tampão fosfato a pH 7,0, governam a interação entre histidina e IDA-Cu⁺², IDA-Ni⁺², IDA-Zn⁺² e IDA-Co⁺²:

1. A ausência de resíduos de histidina na superfície da proteína correlaciona com a não retenção da proteína em qualquer coluna IDA-Me²⁺;
2. A presença de pelo menos um resíduo de histidina disponível para a coordenação resulta na retenção da proteína em um gel de IDA-Cu⁺²;
3. A presença de dois resíduos histidina disponíveis para a coordenação resulta em uma mais forte retenção da proteína em um gel de IDA-Cu⁺²;
4. É necessário que a proteína possua em sua superfície pelo menos dois resíduos de histidina disponíveis para ser retida em um gel de IDA-Ni⁺²;
5. A presença de múltiplos resíduos de histidina, se disponíveis para coordenação, resulta em um aumento da probabilidade de ligação em todas as colunas IDA-Me²⁺;

6. A presença de dois resíduos de histidina espacialmente localizados em uma α -hélice e separados por dois ou três aminoácidos é requerida para a retenção em géis de IDA-Zn⁺² e de IDA-Co⁺²;
7. A retenção de uma proteína que possui dois resíduos de histidina vicinais (efeito quelato) será mais forte, em todos os géis IDA-Me⁺², que a retenção de uma proteína que possui dois resíduos de histidina bem espaçados na estrutura tridimensional.

Assim, Sulkowski (1989), mostrou que a força de retenção das proteínas seguia a seguinte ordem: Cu⁺² > Ni⁺² > Zn⁺² = Co⁺².

2.3.5. Mecanismos de adsorção e dessorção

Na técnica de IMAC, a adsorção de proteínas é baseada na coordenação entre o íon metálico imobilizado e o grupo doador de elétrons na superfície da proteína e ocorre em pHs onde o grupo doador de elétrons (imidazol dos resíduos de histidina, ou tiol da cisteína), presente na superfície da proteína, esteja pelo menos parcialmente desprotonado. Portanto, a adsorção geralmente acontece sob condições alcalinas (Vijayalakshmi, 1989; Gaberc-Porekar e Menart, 2001; Ueda et al., 2003). Sal (NaCl geralmente em concentração de 0,5 a 1 M) é adicionado não apenas para impedir a adsorção iônica não-específica, mas também para aumentar a seletividade e a estabilidade do complexo formado entre o metal e os resíduos de aminoácidos da superfície da proteína (Vijayalakshmi, 1989).

A eluição das proteínas adsorvidas pode ser realizada por adição de EDTA, abaixamento de pH ou por alimentação de um agente competidor com capacidade de interação com o metal. Na eluição por adição de EDTA, ocorre a formação de complexos deste quelato com o metal imobilizado, excluindo efetivamente a proteína, porém, não é um método seletivo (Vijayalakshmi, 1989). Geralmente o EDTA é utilizado para regenerar a coluna após a etapa de eluição.

Quando a eluição é realizada por abaixamento de pH, deve-se controlar as condições ácidas de eluição para evitar a desestabilização da biomolécula e a perda de atividade; evitar a precipitação isoelétrica das proteínas dentro da coluna, que pode provocar baixa recuperação de proteínas; e controlar o desprendimento do metal da coluna, provocado pelo enfraquecimento da interação entre o agente quelante e o metal imobilizado, devido ao abaixamento do pH (Sulkowski, 1985).

A eluição realizada através de agentes competidores, como histidina, glicina e imidazol, que competem com a proteína pelos sítios de adsorção, é adequada uma vez que evita a utilização de baixos pHs para recuperar as proteínas adsorvidas na matriz. No entanto, pode ser necessária a realização de mais uma etapa de processo para se eliminar, assim, o imidazol ou glicina do meio contendo a proteína purificada, caso a presença do agente de eluição não seja desejada (Sulkowski, 1985; Wong et al., 1991; Beitle e Atai, 1992).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Adsorventes

O gel Sepharose 4B e a coluna Histrap HP de 5,0 mL, uma coluna pré-empacotada com níquel imobilizado, com densidade de ligantes de 15,0 $\mu\text{mol Ni}^{2+}/\text{mL}$ gel e capacidade de adsorção de proteínas com cauda de histidina de 40,0 mg proteína-(his)₆/mL gel, foram obtidos da Amersham Biosciences (Suécia). A matriz de afinidade Concanavalin A – agarose 4B (agarose-Con A), constituída de gel de agarose (4% de agarose), ativada com brometo de cianogênio e com densidade de ligantes de 10,0 a 16,0 mg Con A/mL gel, foi obtida da Sigma (EUA).

A coluna de dessalinização PD – 10 Sephadex G 25 Medium foi adquirida da Amersham Biosciences (Suécia).

3.1.2. Reagentes

Ácido iminodiacético (IDA), MES (ácido 2-morfolinoetano sulfônico), MOPS (ácido 3-N-morfolinopropanosulfônico), albumina bovina, Ponceau S, Tween 20, imidazol e metil- α -D-glucopiranosídeo foram obtidos da Sigma (EUA). Ácido etileno-dinitrilo-tetraacético sal dissódico (EDTA), acetato de sódio anidro, sulfato de níquel, sulfato de cobre, Tris(hidroximetil)-aminometano (Tris) foram obtidos da Merck (Alemanha). Cloreto de sódio, fosfato de sódio monobásico anidro, fosfato de sódio bibásico anidro, metanol, etanol, ácido clorídrico e carbonato de sódio foram obtidos da Synth (Brasil) e hidróxido de sódio e glutaraldeído da Nuclear (Brasil). SDS (dodecil sulfato de sódio), acrilamida e glicina obtidos da BioAgency (Brasil), ácido acético e ácido fosfórico da ECIBRA (Brasil) e nitrato de prata da CENNABRÁS (Brasil), foram usados para realização de eletroforese. Azul de bromofenol, TEMED (N, N, N', N'-tetra-metilenodiamina),

persulfato de amônio, glicerol, ditioneitol e marcadores de baixa massa molecular para eletroforese foram adquiridos da Amersham Biosciences (Suécia) e o reagente *Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate*, utilizado na realização do *western blotting* foi adquiridos da Pierce (EUA). Utilizou-se como marcador de eletroforese imunoglobulina G humana (IgG, 99% de pureza) obtida da Aventis Behring (Alemanha). Os demais reagentes utilizados foram todos de grau analítico. Utilizou-se água ultrapura Milli-Q (Millipore, EUA) para a preparação das soluções.

3.1.3. GPV do vírus da raiva recombinante

Neste trabalho foram utilizadas amostras de sobrenadante de cultura celular e de lisado de células contendo GPV, obtidas em reator a partir de células de inseto *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2AcGPV2) transfectadas com o vetor pAc 5.1/V5-His A (Yokomizo et al., 2007). As células S2AcGPV2 modificadas geneticamente foram desenvolvidas pelo grupo do Dr. Carlos Augusto Pereira do Instituto Butantan – SP (Yokomizo et al., 2007) e as amostras contendo GPV produzidas em meios de cultura Sf900II (Gibco – Invitrogen, EUA), com formulação fechada e TC 100 insect medium (Cultilab, Brasil) (formulação no apêndice A) foram fornecidas pela equipe da Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Moraes, do Departamento de Processos Biotecnológicos – FEQ/Unicamp.

3.1.3.1. Sobrenadantes de cultura celular

Dois tipos de sobrenadantes de cultura celular foram utilizados neste estudo de purificação de GPV, de acordo com a disponibilidade de amostras: sobrenadante de cultura celular em meio Sf900II, com concentrações de proteínas totais de aproximadamente 0,06 mg/mL (Lote A) e, sobrenadante de cultura celular em meio TC 100, com concentração de proteínas totais de aproximadamente 0,08 mg/mL (Lote C).

O sobrenadante de cultura celular contendo GPV obtida utilizando o meio de cultivo Sf900II, coletado ao final do cultivo onde a concentração de células era de $1,5 \times 10^7$ células/mL, foi cedido já livre de células, em alíquotas de 50,0 mL em recipiente estéril, congelado e estocado a temperatura de -20°C .

O sobrenadante de cultura celular produzido no biorreator Biostat MD (B. Braun - Alemanha), utilizando-se células S2AcGPV2 e meio de cultivo TC100 suplementado com 3,0 g/L de *yeastolate*, 10,0 g/L de glicose (concentração final), 3,5 g/L de glutamina (concentração final), 1% (v/v) de emulsão lipídica e 0,1% (m/v) de Pluronic F68, com um volume de trabalho de 1,5 L, foi coletado após 164,5 h de cultivo, com concentração de células no final do cultivo de $5,14 \times 10^6$ células/mL, com viabilidade de 89,5%. O sobrenadante livre de células, fornecido em alíquotas de 50,0 mL, foi congelado e estocado a -20°C .

Antes do uso em cromatografia, os sobrenadantes foram descongelados, filtrados através de uma membrana de microfiltração de celulose regenerada com diâmetro de poro de 0,45 μm (Corning, Alemanha) e posteriormente passados em coluna PD-10 (Amersham Biosciences, Suécia).

3.1.3.2. Lisados de células

Dois tipos de lisados de células foram utilizados neste estudo de purificação de GPV, de acordo com a disponibilidade de amostras: lisado de células produzidos em meio Sf900II, com concentração de proteínas totais de aproximadamente 0,23 mg/mL (Lote A) e lisado de células produzido em meio TC 100, com concentração de proteínas totais de aproximadamente 2,15 mg/mL (Lote C).

O lisado de células contendo GPV, obtido utilizando o meio de cultivo Sf900II e tampão de lise (Tris 50 mM, pH 7,8; NaCl 150 mM e 1% de Nonidet P-40), foi fornecido livre de fragmentos de células em alíquotas de 50,0 mL, congeladas e mantidas a -20°C .

O lisado de células produzido em meio de cultivo TC100 suplementado com 3,0 g/L de *yeastolate*, 10,0 g/L de glicose (concentração final), 3,5 g/L de glutamina (concentração final), 1% (v/v) de emulsão lipídica e 0,1% (m/v) de Pluronic F68, com volume de trabalho de 1,5 L, também foi utilizado. A lise foi realizada por sonicação e as amostras fornecidas livre de células, em alíquotas de 50,0 mL e estocadas a -20°C .

Antes do uso em cromatografia, as alíquotas de lisado necessárias ao ensaio foram descongeladas, filtradas através de uma membrana de microfiltração de celulose regenerada com diâmetro de poro de 0,45 μm (Corning, Alemanha) e posteriormente passadas em coluna PD-10 (Amersham Biosciences, Suécia).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Ativação da matriz de agarose 4B com epicloridrina

O gel de agarose 4B (Amersham Biosciences, Suécia) foi ativado com epicloridrina, baseado no procedimento descrito por Porath e Olin (1983). A matriz (gel de agarose), previamente lavada com água ultra pura, foi colocada em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, onde adicionou-se 50,0 mL de solução de NaOH 2 M contendo 5,0 mL de epicloridrina e 0,266 g de boroidreto de sódio (NaBH_4). A suspensão foi deixada sob agitação por 15 minutos em temperatura ambiente, gotejando-se, em seguida, durante um período de 2 h, 50,0 mL de NaOH 2 M e 23,3 mL de epicloridrina simultaneamente, a uma vazão de 0,27 e 0,13 mL/min, respectivamente, para evitar o aumento da temperatura durante a reação. A mistura foi deixada sob agitação por mais 16 h em temperatura ambiente e após o término da reação, lavou-se a matriz com água ultra pura para remoção de excesso de epicloridrina até verificação de mesmo valor de pH da água ultra pura.

3.2.2. Imobilização do ácido iminodiacético (IDA)

Ao gel de agarose previamente ativado com epícloridrina, adicionou-se uma solução de carbonato de sódio 2 M. Preparou-se, então, uma solução de 26,0 g de IDA dissolvida em 65,0 mL de NaOH 2 M onde adicionou-se pastilhas de NaOH até se atingir pH 10 e, em seguida, uma solução de carbonato de sódio 2 M (65,0 mL). Mantendo-se o pH 10, as soluções de IDA e carbonato foram misturadas e adicionadas à matriz, mantendo-se sob agitação por 24 h e em temperatura de 65°C. Ao término da reação, com o intuito de remover o excesso de IDA não imobilizado, o gel foi lavado com água até verificação de mesmo valor de pH da água ultra pura (Porath e Olin, 1983).

3.2.3. Determinação da quantidade de íon metálico níquel imobilizado

A determinação da quantidade de metal quelatado na matriz agarose-IDA foi determinada segundo procedimento descrito por Serpa (2002). Primeiramente alimentou-se, na coluna cromatográfica, solução de sulfato de níquel 50 mM até a saturação e lavou-a com água ultra pura e tampão acetato 100 mM a pH 4,0 para retirar o íon metálico fracamente quelatado. Realizou-se, então, a eluição do íon níquel alimentando-se solução de EDTA 50 mM a pH 7,0, recolhendo-se as frações de eluição em frações de 3,0 mL e analisando-as por medida de absorvância a um comprimento de onda de 378 nm, determinado por varredura em espectrofotômetro. A concentração de níquel foi determinada utilizando-se um coeficiente de extinção obtido a partir de curva de calibração do níquel em solução de EDTA 50 mM pH 7,0 no comprimento de onda de 378 nm.

3.2.4. Experimentos Cromatográficos

3.2.4.1. Cromatografia em agarose-IDA-Me²⁺

As cromatografias foram realizadas para determinar o perfil de eluição da GPV em diferentes sistemas tamponantes. Uma coluna cromatográfica da Amersham Biosciences (Suécia) (modelo C 10/10; 10 mm de diâmetro interno x 10 cm de altura) foi preenchida com 5,0 mL de gel agarose-IDA e conectada a um sistema de cromatografia de baixa pressão (Gilson, EUA). A corrente de saída foi conectada a um monitor de medida de absorvância a 280 nm e este ligado ao coletor de frações (Figura 3.1).

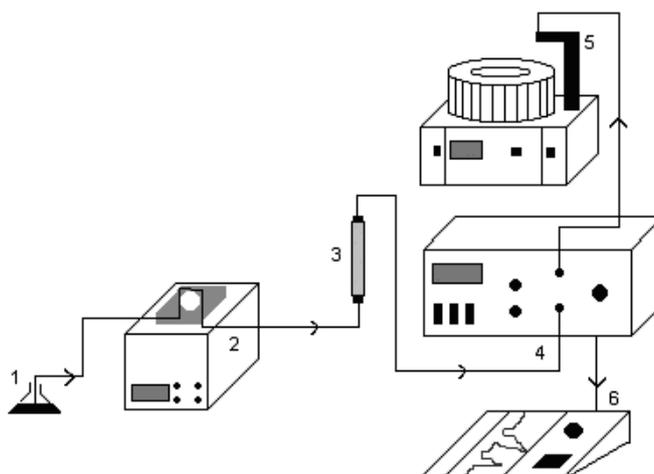


Figura 3.1. Sistema cromatográfico: 1. Amostra, 2. Bomba peristáltica, 3. Coluna cromatográfica, 4. Medidor de absorvância a 280 nm, 5. Coletor de frações, 6. Registrador.

A coluna contendo o adsorvente (agarose-IDA) foi alimentada, até a saturação, com uma solução a 50 mM de sulfato de níquel e, em seguida, lavada seqüencialmente com água ultra pura e com tampão de eluição, com o objetivo de remover o metal fracamente adsorvido na matriz. Em seguida, a coluna foi equilibrada com o tampão de adsorção (tampão de equilíbrio) a uma vazão de 0,5

mL/min e em temperatura ambiente. A alimentação de amostra protéica foi realizada na mesma vazão da etapa de equilíbrio, alimentando-se a coluna cromatográfica com 5,0 mL de sobrenadante ou 5,0 mL de lisado. Para favorecer a adsorção, realizou-se a troca do tampão em que amostras de lisado e sobrenadante se encontravam inicialmente, para o tampão de equilíbrio utilizado na coluna e, para isso, utilizou-se colunas PD-10 Sephadex G 25 Medium (Amersham Biosciences, Suécia).

Após o término da alimentação, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de adsorção, na mesma vazão, até que todas as proteínas não adsorvidas fossem retiradas da coluna. Após a lavagem, a eluição foi realizada em etapas, de maneira gradativa, por abaixamento de pH ou com adição de um agente competitivo (imidazol) no tampão de equilíbrio e, então, a coluna foi regenerada com solução de EDTA 50 mM a pH 7,0. A corrente de saída foi coletada durante todo o experimento em frações de volume de 2,5 mL para análises posteriores. Os experimentos foram realizados em duplicata (Apêndice A).

O íon metálico cobre também foi imobilizado, porém, neste caso, a coluna foi preenchida com 3,0 mL de gel de agarose-IDA. Alimentou-se, portanto, a coluna com 3,0 mL de lisado de células e coletou-se frações cromatográficas de 1,5 mL na corrente de saída.

3.2.4.2. Cromatografia em agarose - Concanavalina A

A coluna cromatográfica da Amersham Biosciences (Suécia) (modelo C 10/10) foi preenchida com 3,0 mL de gel agarose-Con A e conectada ao sistema de cromatografia de baixa pressão (Gilson, EUA), conforme descrito na Figura 3.1.

A coluna foi equilibrada a temperatura ambiente a uma vazão de 0,2 mL/min com o tampão de adsorção. Para a etapa de adsorção, utilizou-se o tampão 20 mM Tris-HCl com 500 mM de NaCl, 1 mM $MnCl_2$ e 1 mM de $CaCl_2$ a pH 7,4. A alimentação foi realizada a uma vazão de 0,3 mL/min, injetando-se 3,0 mL de lisado em tampão de adsorção.

Após o término da alimentação, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de adsorção, na vazão de 0,4 mL/min, até que todas as proteínas não adsorvidas fossem retiradas da coluna. A eluição foi realizada com o tampão metil- α -D-glucopiranosídeo 500 mM, Tris-HCl 20 mM e NaCl 500 mM a pH 7,4, a vazão de 0,3 mL/min. A coluna foi regenerada primeiramente com tampão de equilíbrio a uma vazão de 0,4 mL/min e posteriormente com solução contendo 500 mM NaCl e 20 mM Tris-HCl, pH 8,5 (vazão de 0,4 mL/min) e solução contendo 500 mM NaCl e 20 mM acetato, pH 4,5 (vazão de 0,4 mL/min), repetindo este procedimento 3 vezes. Para remoção de substâncias fortemente adsorvidas, injetou-se uma solução 20% de etanol com vazão 0,4 mL/min. A coluna foi, então, reequilibrada com tampão de equilíbrio (vazão de 0,4 mL/min), seguindo-se com a injeção de tampão de armazenagem (20% etanol em 0,1 M acetato, 1 M NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MnCl_2 e 1 mM MgCl_2) a pH 6,0 (vazão 0,4 mL/min).

A corrente de saída foi coletada durante todo o experimento em frações de volume de 1,5 mL. As frações obtidas foram monitoradas a 280 nm, quantificadas pelo procedimento descrito por Bradford (1976) e aquelas situadas nos picos de proteína foram agrupadas e analisadas por eletroforese SDS-PAGE.

3.2.4.3. Cromatografia em coluna Histrap

Os ensaios cromatográficos foram realizados com a coluna comercial Histrap (Amersham Biosciences, Suécia), que consiste em uma coluna contendo 5 ml de agarose com níquel imobilizado em um agente quelante não informado pelo fabricante. A cromatografia foi realizada em um sistema de baixa pressão, conforme descrito na Figura 3.1.

A coluna foi equilibrada com o tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 7,0, ou tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM pH 7,4, a uma vazão de 0,5 mL/min e em temperatura ambiente. Alimentou-se a coluna cromatográfica com 5 mL de lisado e posteriormente lavou-se a coluna com tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 6,0, ou tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM pH 7,4, na vazão de 0,5 mL/min,

até que todas as proteínas não adsorvidas fossem retiradas da coluna. Após a lavagem, a eluição foi realizada em etapas, com aumento da concentração de um agente competitivo (imidazol) no tampão de lavagem. A corrente de saída foi coletada durante todo o experimento em frações de volume de 2,5 mL para análises posteriores. Os experimentos foram realizados em duplicata (Apêndice A).

3.2.5. Quantificação de proteína total

A concentração de proteína total nas amostras foi determinada utilizando o método de Bradford, conforme o procedimento descrito por Bradford (1976), com albumina do soro bovino (BSA) como proteína de referência.

3.2.6. Eletroforese SDS-PAGE “SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis”

Com o intuito de verificar a seletividade do adsorvente em função do sistema tamponante, as frações obtidas nas etapas cromatográficas de lavagem, eluição e regeneração foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE realizada no equipamento Mini Protean III (BioRad, EUA) utilizando gel de poliacrilamida 10%, sob condições não-redutoras, conforme procedimento descrito por Delm et al. (1999). As proteínas das amostras foram primeiramente desnaturadas aquecendo-as a 100°C por 7 min e então aplicadas em alíquotas de 10 µL nos géis de eletroforese, submetidos à uma voltagem de 180 V em cuba vertical contendo tampão de corrida Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 3,5 mM.

A coloração dos géis foi feita com nitrato de prata, conforme Morrissey (1981), pré-fixando o gel por 20 min sob agitação em 50% de metanol e 10% de ácido acético e posteriormente em 5% de metanol e 7% de ácido acético novamente por 20 min. Em seguida, colocou-se o gel em solução aquosa de glutaraldeído a 10% por 20 min e lavou-se o gel com água destilada por 1 h. Adicionou-se ao gel solução de ditiotreitol a uma concentração de 5,0 µg/mL, que permaneceu em contato com o mesmo por 20 min e, em seguida, adicionou-se

solução contendo 0,1% de nitrato de prata, mantendo sob agitação por 20 min. Posteriormente, lavou-se o gel com água destilada e adicionou-se solução reveladora (50 mL de formaldeído a 37% (m/v) em 100 mL de carbonato de sódio a 3% (m/v)), mantendo sob agitação até a visualização das bandas de proteínas no gel. Para finalizar a reação, adicionou-se 5,0 mL de ácido cítrico 2,3 M e após agitar por 10 min, lavou-se o gel por 30 min com água destilada.

Utilizou-se nas eletroforeses marcador de baixa massa molecular (Amersham Biosciences, Suécia) contendo as seguintes proteínas: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). Utilizou-se também IgG humana como marcador (sob condições redutoras), apresentando bandas de 50 kDa e 25 kDa.

3.2.7. Eletroforese nativa

A eletroforese nativa foi realizada com mesmo protocolo da eletroforese SDS-PAGE, porém retirando-se o SDS (dodecil sulfato de sódio) dos géis e tampões, não desnaturando a proteína e utilizando tampão de corrida em pH 7,5. As proteínas das amostras foram aplicadas em alíquotas de 10 μ L nos géis de poliacrilamida de 7,5% e 10%, submetidos à uma voltagem de 180 V em cuba vertical contendo tampão de corrida Tris 25 mM, glicina 192 mM pH 7,5.

Utilizou-se nas eletroforeses marcador de baixa massa molecular (Amersham Biosciences, Suécia) contendo as seguintes proteínas: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa) e, marcador de alta massa molecular (Amersham Biosciences, Suécia) contendo as seguintes proteínas: miosina (212 kDa), α_2 – macroglobulina (170 kDa), β – galactosidase (116 kDa), transferrina (76 kDa) e desidrogenase glutâmica (53 kDa).

A coloração dos géis foi feita com nitrato de prata, conforme Morrissey (1981), apresentado anteriormente.

3.2.8. Precipitação por sulfato de amônio

A precipitação de proteínas por sulfato de amônio foi realizada de acordo com o procedimento descrito por El-Kak e Vijayalakshmi (1991), utilizando-se lisado de células produzidos em meio TC100.

As alíquotas de lisado de células foram descongeladas e precipitadas com solução de sulfato de amônio a 40% (1,6 mL de sulfato de amônio, 2,4 mL de lisado), 50% (2,0 mL de sulfato de amônio, 2,0 mL de lisado), 60% (2,4 mL de sulfato de amônio, 1,6 mL de lisado), e 70% (2,8 mL de sulfato de amônio, 1,2 mL de lisado) de saturação, a 4 °C, acrescentando-se solução saturada de sulfato de amônio gota-a-gota ao lisado e mantendo-se, em seguida, a solução sob agitação por 1h a 4 °C. Posteriormente, o material foi centrifugado a 10.000 g por 15 min e o precipitado obtido foi dissolvido em 300 µL de tampão PBS e dialisado, em sacos de diálise com tamanho nominal de corte de 12 a 16 kDa de celulose regenerada (Interlab, Brasil), por 30 h, sob agitação, contra 2 L do mesmo tampão, trocados 3 vezes. Para a realização do ELISA, o volume do precipitado foi completado para 1 mL.

3.2.9. Quantificação da GPV por ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”)

A concentração da GPV presente nas frações cromatográficas foi determinada por ensaios do tipo ELISA utilizando-se anticorpos monoclonais ou policlonais disponíveis nos kits comerciais de ELISA (Sanofi Diagnostics Pasteur S.A – França). Como anticorpo de sensibilização utilizou-se: anticorpo monoclonal imunoglobulina G de camundongo anti-glicoproteína da raiva semi-purificado ou anticorpo policlonal imunoglobulina G de coelho anti-glicoproteína G da raiva purificado. Os testes ELISA foram realizados no Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan (SP) conforme o procedimento indicado pelo fabricante do kit, com as etapas descritas a seguir.

3.2.9.1. Sensibilização da placa

Diluiu-se o anticorpo de sensibilização (1/200) em tampão carbonato de sódio 0,05 M pH 9,6, distribuiu-se 200 µL/poço e incubou-se a placa selada por 3 h a 37°C. Verteu-se a placa e secou-se em papel de filtro por 5 min. Distribuiu-se, então, 300 µL/poço de solução de bloqueio (0,3% BSA, 5% sacarose em tampão carbonato de sódio 0,05 M pH 9,6) e incubou-se a placa selada durante 30 min a 37°C. Verteu-se a placa, secou-se em papel filtro durante 1 min, lavou-se 5 vezes em solução de lavagem (Tween 0,05% em tampão PBS 4,6 mM, pH 7,0) e secou-se novamente em papel de filtro durante 1 min.

3.2.9.2. Ensaio

Realizou-se a diluição da vacina de referência purificada e inativada, em tampão PBS 4,6 mM pH 7,0 suplementado com 0,05% de Tween 20 e 75 mM de BSA, com 7 pontos de diluição (500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8 ng/mL) e adicionou-se, em duplicata, 200 µL/poço, as referências diluídas, o branco (Tween 0,05%, BSA 75 mM em tampão PBS 4,6 mM pH 7,0) e as frações cromatográficas. Após 1 h de incubação a 37°C, a placa foi lavada 5 vezes em solução de lavagem.

Distribuiu-se, então, 200 µL/poço de anticorpo monoclonal ou policlonal conjugado à peroxidase diluído (1/200) em Tween 0,05%, BSA 75 mM em tampão PBS 4,6 mM pH 7,0 e incubou-se a placa selada novamente durante 1 h a 37°C. A placa foi lavada 6 vezes em solução de lavagem e seca em papel de filtro durante 1 min. Posteriormente, adicionou-se 200 µL/poço de solução de substrato cromógeno 2 mg/mL em tampão para peroxidase (tampão citrato trissódico 40 mM, ácido cítrico 10 mM, peróxido de hidrogênio 0,1%) e incubou-se a placa selada por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. Distribuiu-se, por fim, 50 µL/poço de solução de parada (ácido sulfúrico 4 N e água) e realizou-se a medida de absorbância no leitor de microplacas a 492 nm. A concentração de glicoproteína G

das frações foi determinada comparando valores de densidade óptica (OD) das amostras com os valores de OD das diluições da vacina de referência.

Cliquet et al. (2003) determinaram a precisão do ELISA como sendo de 87% para vacinas virais. Como na quantificação da GPV purificada, utiliza-se, como referência, a vacina anti-rábica viral, o resultado pode estar sendo subestimado. Isso ocorre porque apesar do anticorpo primário se ligar a apenas uma partícula viral, o anticorpo secundário poderá identificar as diversas glicoproteínas que estão na superfície do vírus, potencializando o sinal na referência.

O teste ELISA foi realizado inicialmente utilizando anticorpos monoclonais como anticorpos primários e secundários. Porém, neste caso, devido a possível competição entre os anticorpos primários e secundários pelo mesmo sítio de adsorção, realizou-se também o teste ELISA utilizando anticorpos policlonais como anticorpos primários e secundários.

3.2.10. Imunização de coelhos com vírus da raiva inativados

Para a obtenção do anticorpo primário utilizado no *western blotting*, a equipe da Prof^a. Wirla M. S. C. Tamashiro do Instituto de Biologia da Unicamp imunizou três coelhos albinos jovens, Nova Zelândia, com vacina Rabisin-i (Merial Saúde Animal Ltda, Brasil). Esta vacina inativada, é indicada pelo WHO (World Health Organization) por ter máxima potência contra raiva sem apresentar reversão da virulência, recomendando-se a aplicação de uma dose anual.

Primeiramente no dia zero, imunizou-se os coelhos com uma dose vacinal por via subcutânea (sc), realizando-se, posteriormente, no dia 35, a aplicação de uma dose vacinal por via intramuscular (im) e no dia 111 a aplicação de uma dose vacinal por via intramuscular (im). Constatou-se que após a terceira dose de imunização com a vacina Rabisin-i (Merial Saúde animal Ltda, Brasil), os coelhos produziram anticorpos séricos capazes de reconhecer as preparações de vacinas anti-rábicas da Merial (Brasil) e do instituto Pasteur (Ag padrão do ELISA) por *dot blotting*.

3.2.11. Western Blotting

Preparou-se o gel de poliacrilamida 10% e injetou-se 50 μ L de amostra de alimentação, lavagem e eluição, previamente preparadas com tampão de amostra 4X (1 M Tris-HCl pH 6,8; β -mercaptoetanol; glicerol; SDS; 0,1% azul de bromofenol e água deionizada) na proporção de 4:1, nos respectivos poços.

Para realizar-se a transferência, tiras de membrana de nitrocelulose (BioRad, EUA), esponjas, papel Wattman 3 e a eletroforese foram umedecidas em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM de glicina, 20% metanol pH 8,1-8,4), montados de acordo com a Figura 3.2 e inseridas no equipamento Mini Transblotting (BioRad, EUA). Aplica-se, então, uma corrente elétrica entre as placas alocadas no equipamento, que promove a transferência das proteínas carregadas do gel para a membrana de nitrocelulose, mantendo a mesma posição em que se encontravam no gel. A transferência foi realizada aplicando-se uma voltagem constante de 100 V por cerca de 2 h.

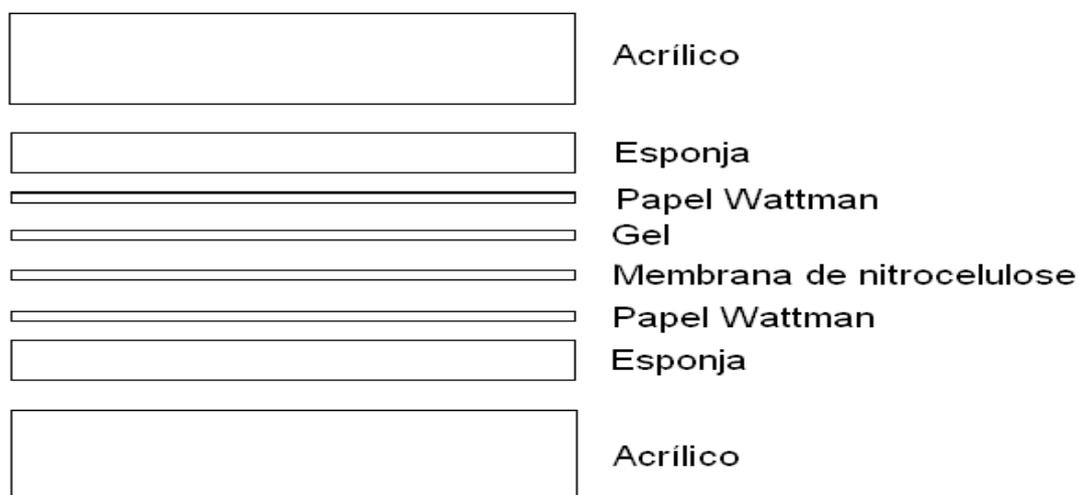


Figura 3.2. Montagem para a realização da transferência.

Após a corrida de transferência, corou-se a membrana de nitrocelulose com solução de Ponceau S (Sigma, EUA) 0,5%, cortou-se o pedaço de tira de membrana de nitrocelulose que continha as proteínas padrão de baixa massa molecular e corou-a com solução de amido black 0,5%.

As outras tiras de membrana de nitrocelulose foram bloqueadas, incubando-as por 1 h a temperatura ambiente em tampão de bloqueio (PBS 0,02 M pH 7,2 contendo 5% de leite desnatado (Molico, Brasil) e 0,1% de Tween 20 (Sigma, EUA)). Decantou-se, então, o tampão de bloqueio e adicionou-se solução de lavagem (PBS 0,02 M pH 7,2 contendo 0,1% de Tween 20 (Sigma, EUA)). Agitou-se por 5 min, descartou-se a solução e repetiu-se o procedimento mais 2 vezes. Então, adicionou-se o anticorpo primário (soro de coelho imunizado com a vacina Rabisin-i (Merial Saúde animal Ltda, Brasil), como descrito no item 3.2.10.), diluído 1:200 em tampão PBS 0,02 M pH 7,2 contendo 2% de leite desnatado (Molico, Brasil) e 0,1% de Tween 20 (Sigma, EUA), e incubou-se por 1 h a 37°C e em seguida durante uma noite a 4°C.

Decantou-se a solução do anticorpo primário e adicionou-se solução de lavagem, lavando por 30 min sob agitação ocasional, trocando o tampão a cada 6 min. Decantou-se a solução de lavagem e adicionou-se o anticorpo secundário (anticorpo IgF de carneiro anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase), preparado pela equipe da Prof^a. Wirla M. S. C. Tamashiro do Instituto de Biologia da Unicamp, diluído 1: 16000 em tampão PBS 0,02 M pH 7,2 contendo 2% de leite desnatado (Molico, Brasil) e 0,1% de Tween 20 (Sigma, EUA) e, incubou-se a 37°C por 2 h. Decantou-se, então, a solução do anticorpo secundário e adicionou-se tampão de lavagem, lavando por 30 min, sob agitação ocasional, trocando tampão a cada 5 min.

Após decantar a solução de lavagem, adicionou-se o reagente *Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrates* (Pierce, EUA) às membranas de nitrocelulose e deixou reagir por 5 min. Posteriormente, em câmara escura, as tiras secas de membrana de nitrocelulose foram colocadas entre folhas transparentes sobre as quais colocou-se o filme de raio X, deixando-se o conjunto em contato por 2 min. Revelou-se então o filme de raio X em solução reveladora para uso odontológico (Kodak, Brasil), agitando até o aparecimento das bandas. Levou-se então o filme à água por alguns segundos e posteriormente em fixador dental (Kodak, Brasil).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EFEITO DO SISTEMA TAMPONANTE NA ADSORÇÃO DE GPV EM AGAROSE-IDA-NI²⁺

Em IMAC de proteínas (nativas ou recombinantes com cauda de polihistidina), a seletividade e a capacidade do adsorvente são, em geral, fortemente afetadas pelo pH e pelos sistemas tamponantes empregados nas etapas de adsorção e eluição. Com o objetivo de verificar a influência destas duas variáveis em IMAC na purificação de GPV, selecionou-se cinco sistemas tamponantes. A seleção dos tampões baseou-se no seguinte critério: a) estudar diferentes estratégias de dessorção (abaixamento de pH e adição de agente competitivo); b) estudar o efeito de tampões e agentes competitivos não clássicos em IMAC (tampão MMA e Tris-HCl como agente competitivo). Assim, foram empregados os sistemas tamponantes MMA e fosfato-acetato para estudo da dessorção por abaixamento de pH e os sistemas fosfato-imidazol, MOPS-imidazol e Tris-HCl para estudos da dessorção por aumento de concentração agente competitivo.

4.1.1. Efeito do sistema tamponante e da eluição por abaixamento de pH na purificação de GPV

4.1.1.1. Efeito do sistema tamponante MMA

O tampão MMA é composto de MOPS, MES e acetato de sódio. MOPS e MES são “Good buffers” (Good et al., 1966), que contêm grupos positivos e negativos ionizáveis na mesma molécula, e se encontram na forma zwitteriônica quando empregados em pHs abaixo de seu pKa (pKa igual a 7,2 e 6,15 para MOPS e MES, respectivamente). O tampão MMA é recomendado em somas

equimolares dos três componentes quando se deseja manter o mesmo sistema tamponante em todo o processo cromatográfico.

Uma vez que MMA tampona em uma ampla faixa de pH, é possível utilizá-lo nas etapas de adsorção (pH 7,0) e eluição (pHs 6,0, 5,0 e 4,0), sem necessidade de alterar os íons do sistema tamponante (Mrabet, 1992; Sidenius et al., 1999; Todorova-Balvay et al., 2004) e, quando empregado por Vançan et al. (2002) para a purificação de IgG humana em agarose-IDA-Ni²⁺, este tampão promoveu maior retenção da proteína na coluna comparado ao sistema tamponante fosfato-acetato.

Com este sistema tamponante, foi realizada a comparação do perfil cromatográfico e eletroforético em função da solução de alimentação: sobrenadante e lisado, provenientes de ensaios realizados em meio Sf900II e TC 100. Primeiramente apresentam-se os perfis cromatográficos e eletroforéticos para alimentação de sobrenadante de cultura celular em meio Sf900II e lisado de células contendo GPV (Figura 4.1). Observa-se nas duas amostras, lisado e sobrenadante, uma grande variedade de proteínas.

No caso do sobrenadante, as eletroforeses indicaram a presença de uma proteína com massa molecular de aproximadamente 57 kDa, que se supõe ser a GPV, nas frações de lavagem com presença de impurezas, e uma pequena quantidade desta proteína presente nas frações de eluição. Para o lisado de células, a eletroforese indicou a presença da proteína de aproximadamente 57 kDa nas frações de eluição, porém com grande quantidade de impurezas, demonstrando, para ambos os casos (sobrenadante e lisado), que o sistema tamponante MMA não promoveu alta seletividade na purificação da proteína desejada.

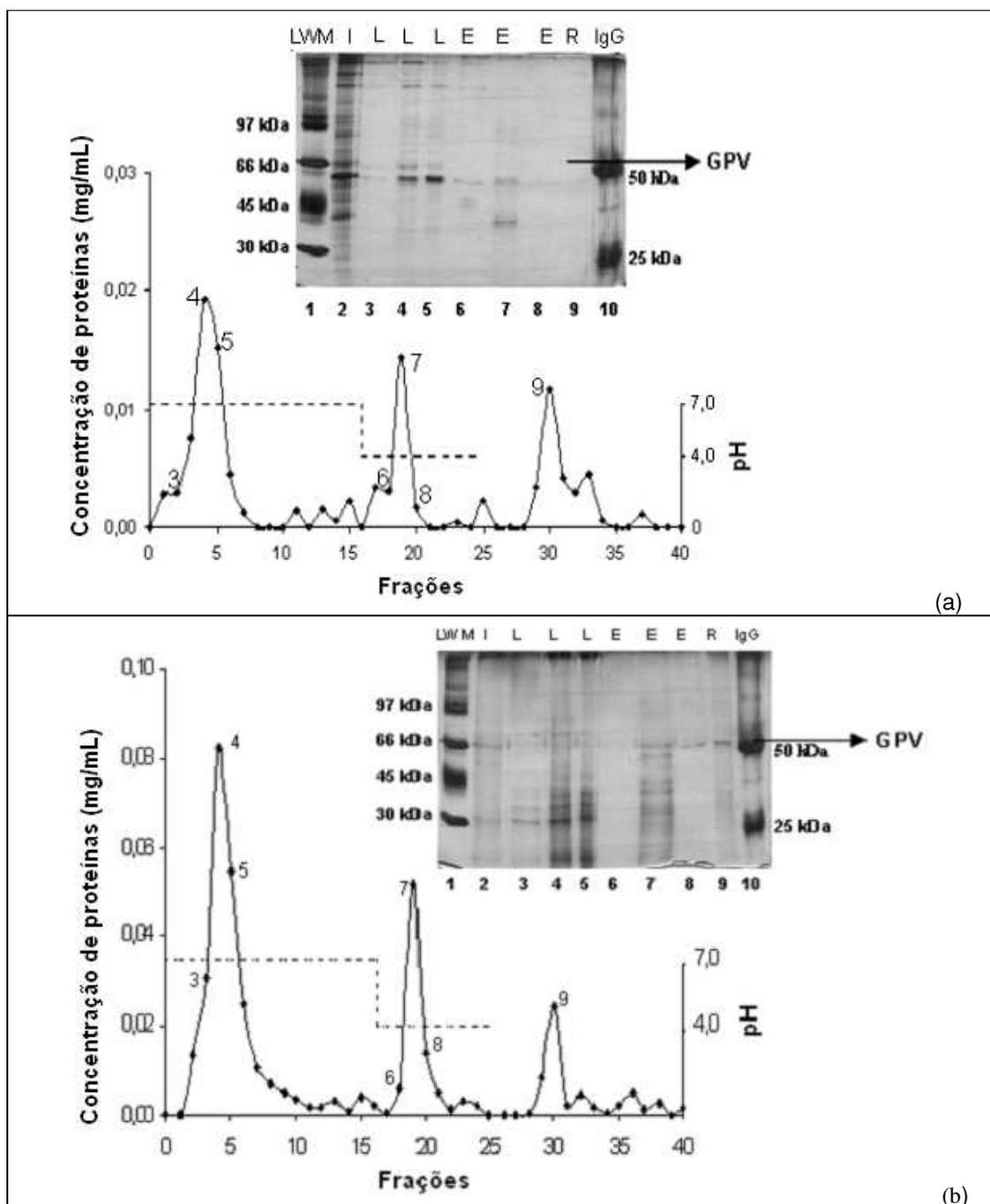


Figura 4.1. Cromatografia de sobrenadante de cultura celular (Sf900II – lote A) (a) e do lisado de células (Sf900II – lote A) (b) no sistema tamponante MMA em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Adsorção com MMA 50 mM, NaCl 1 M pH 7,0, dessorção com MMA 50 mM, NaCl 1 M pH 4,0 e regeneração EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-5. lavagem (L), 6-8. eluição (E), 9. regeneração (R), 10. marcador de IgG humana (Aventis). Realizado em duplicata (Apêndice A).

A Tabela 4.1 apresenta os balanços de massa das cromatografias em termos de proteína total. Observa-se nos balanços de massa, que a maior parte das proteínas foi eliminada nas frações de lavagem para ambas as alimentações (sobrenadante e lisado).

Tabela 4.1. Balanços de massa para proteína total das cromatografias em agarose-IDA-Ni²⁺ utilizando o sistema tamponante MMA, com alimentação de sobrenadante e lisado (Sf900II).

Frações	Tipo de Alimentação			
	Sobrenadante (lote A)		Lisado (lote A)	
	(mg) ¹	(%) ²	(mg) ¹	(%) ²
Alimentação	0,30	100,00	1,12	100,00
Lavagem	0,15	49,98	0,61	54,72
Eluição	0,06	21,20	0,22	19,37
Regeneração	0,07	23,87	0,14	12,35
Recuperação	0,28	95,05	0,97	86,44

¹ Massa calculada por meio de dosagem de proteínas totais (Bradford, 1976)

² Porcentagem relativa à massa de proteína total injetada

Para quantificar a GPV nas frações cromatográficas, realizou-se o teste ELISA (Tabela 4.2). O teste ELISA foi realizado com as frações cromatográficas de lavagem, eluição e regeneração que apresentaram maior concentração de proteínas totais e não com os “pools” das etapas cromatográficas. Por esse motivo não foi possível realizar o balanço de massa em termos de GPV. Além disso, como a curva padrão para a dosagem de GPV (Apêndice A) abrange uma faixa de concentração de 7,5 a 250 ng/mL de GPV, valores abaixo de 7,5 ng/mL foram obtidos por extrapolação.

Observa-se pelo teste ELISA maior concentração de GPV nas amostras de alimentação de lisado que nas de sobrenadante. Porém, o teste não detectou a proteína de interesse nas frações cromatográficas de lavagem, eluição e regeneração. Isso pode ter ocorrido devido ao fato da concentração de GPV nas

frações analisadas ser supostamente muito baixa, que provocaria interferência no resultado do ELISA uma vez que o teste seria mais adequado para concentrações de GPV maiores que 25 ng/mL, ou por uma possível instabilidade da proteína em decorrência da queda de pH, uma vez que uma permanência prolongada da proteína em pHs baixos poderia inativar a proteína (Da Poian et al., 2005). As frações dosadas nos ensaios do tipo ELISA não foram neutralizadas para evitar que as amostras fossem diluídas, o que poderia prejudicar a análise.

Tabela 4.2. Concentração de GPV nas frações cromatográficas (sistema tamponante MMA) e alimentação de sobrenadante e lisado (Sf900II).

Frações	Tipo de Alimentação			
	Sobrenadante (lote A)		Lisado (lote A)	
	Concentração GPV (ng/mL)*	GPV* (ng)	Concentração GPV* (ng/mL)	GPV* (ng)
Alimentação	25,20	126,00	44,87	224,35
Lavagem	nd**	-	nd**	-
Eluição	nd**	-	nd**	-
Regeneração	nd**	-	nd**	-

* Teste ELISA realizado com anticorpos policlonais

** nd: não detectado

Posteriormente verificou-se o perfil cromatográfico com a alimentação de lisado de células em meio TC100 no mesmo sistema tamponante, porém com dessorção primeiramente realizada por abaixamento de pH para 4,0 e posteriormente por abaixamento de grau de pH para 6,0, 5,0 e 4,0, na tentativa de se obter uma maior concentração de proteínas nas frações de eluição. O sobrenadante de cultura celular produzido em meio TC 100 não foi utilizado, uma vez que foi observada maior concentração de proteínas totais no lisado (2,15 mg/mL) do que no sobrenadante (0,08 mg/mL). Os cromatogramas e eletroforeses estão apresentados nas Figuras 4.2 e 4.3.

As eletroforeses indicaram para ambos os tipos de eluição a presença de uma proteína com massa molecular de aproximadamente 57 kDa nas frações de

eluição, porém em maior quantidade nas frações de regeneração com a presença de muitas impurezas. Além disso, observa-se pouca diferença nos perfis de eluição comparando-se a eluição a pH 4,0 com a eluição gradativa (pH 6,0; 5,0 e 4,0).

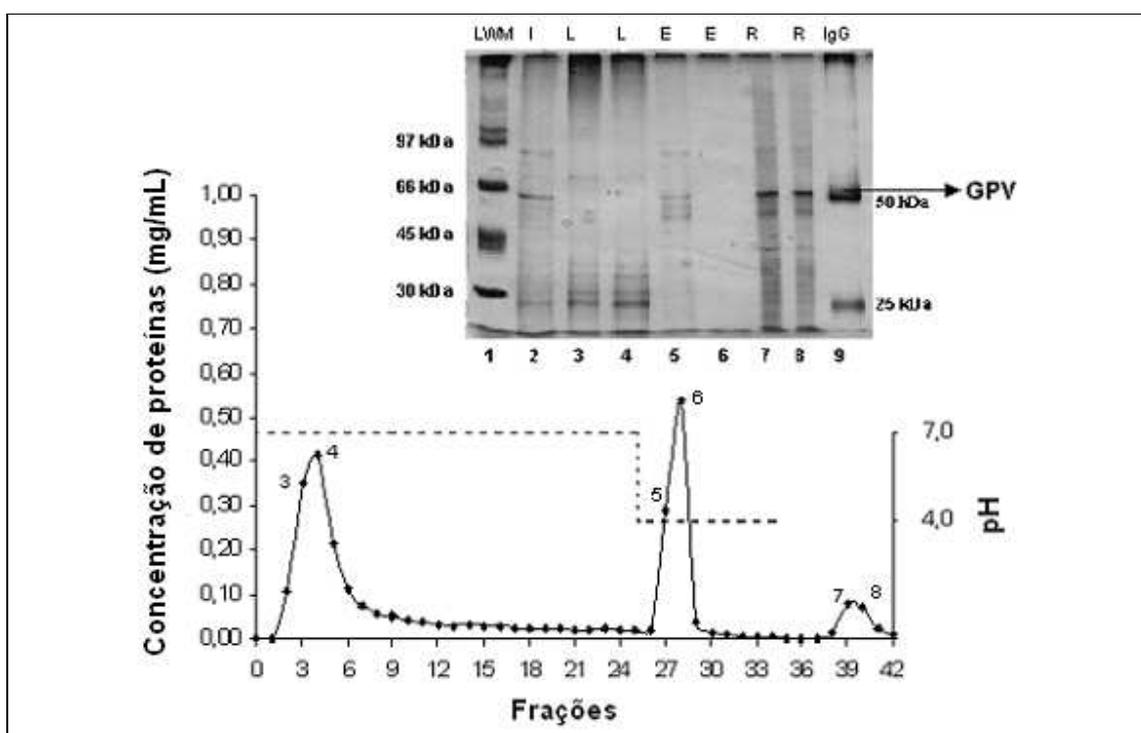


Figura 4.2. Cromatografia de lisado de células (TC100 – lote C) no sistema tamponante MMA em agarose-IDA-Ni²⁺. Adsorção com MMA 50 mM, NaCl 1 M pH 7,0; dessorção por abaixamento de pH para 4,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição (E), 7-8. regeneração (R), 9. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições de amostras para a eletroforese: 2 (20X), 3/4/5 (5X), 6 (10X).

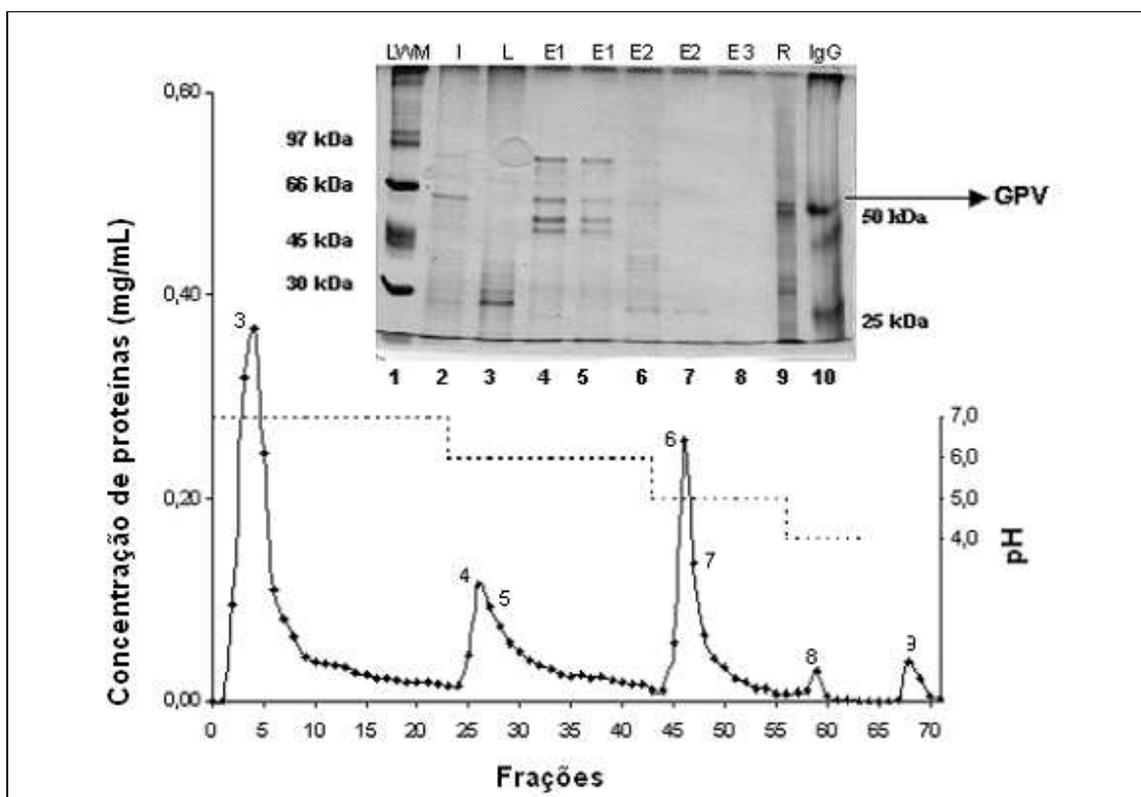


Figura 4.3. Cromatografia de lisado de células (TC100 – lote C) no sistema tamponante MMA em agarose-IDA-Ni²⁺. Adsorção: MMA 50 mM, NaCl 1 M pH 7,0; dessorção por abaixamento de pH para 6,0, 5,0 e 4,0, e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3. lavagem (L), 4-5. eluição 1 (E1), 6-7. eluição 2 (E2), 8. eluição 3 (E3), 9. regeneração (R), 10. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições de amostras para a eletroforese: 2 (30X), 3 (7X), 4/5 (2X), 6 (5X), 7 (3X).

A Tabela 4.3 apresenta os balanços de massa das cromatografias, na qual nota-se de 50 a 65% de proteínas totais nas frações de lavagem. Comparando-se as duas formas de eluição utilizadas, maior quantidade de proteínas totais foi obtida nas frações de eluição quando esta foi realizada gradativamente.

Tabela 4.3. Balanços de massa para proteína total de cromatografias em agarose-IDA-Ni²⁺ utilizando o sistema tamponante MMA, com alimentação de lisado (TC 100).

Frações	Tipo de Alimentação			
	Lisado (lote C) ¹		Lisado (lote C) ²	
	(mg) ³	(%) ⁴	(mg) ³	(%) ⁴
Alimentação	6,85	100,00	8,17	100,00
Lavagem	4,43	64,65	4,14	50,62
Eluição 1	2,34	34,22	1,92	23,42
Eluição 2	-	-	1,72	21,03
Eluição 3	-	-	0,17	2,11
Regeneração	0,52	7,65	0,19	2,27
Recuperação	7,29	106,53	8,13	99,46

¹ Sistema tamponante MMA, dessorção por diminuição de pH para 4,0

² Sistema tamponante MMA, dessorção por diminuição gradativa de pH para 6,0, 5,0, 4,0

³ Massa calculada por meio de dosagem de proteínas totais (Bradford, 1976)

⁴ Porcentagem relativa à massa de proteína total injetada

Para quantificar a GPV nas frações cromatográficas, realizou-se o teste ELISA (Tabela 4.4). Observa-se uma elevada massa de GPV na fração de alimentação e maior quantidade da proteína nas frações de lavagem que nas de eluição, para ambos os casos analisados.

Tabela 4.4. Concentração de GPV nas frações cromatográficas (sistema tamponante MMA) e alimentação de lisado (TC100).

Frações	Tipo de Alimentação			
	Lisado (lote C) ¹		Lisado (lote C) ²	
	Concentração GPV (ng/mL)*	GPV (ng)*	Concentração GPV (ng/mL)*	GPV (ng)*
Alimentação	52,56	262,80	60,99	304,95
Lavagem	4,61	11,53	2,87	7,18
Eluição 1	0,69	1,73	nd**	-
Eluição 2	-	-	nd**	-
Eluição 3	-	-	nd**	-
Regeneração	nd**	-	nd**	-

¹ Sistema tamponante MMA, dessorção por diminuição de pH para 4,0

² Sistema tamponante MMA, dessorção por diminuição gradativa de pH para 6,0, 5,0, 4,0

* Teste ELISA realizado com anticorpos policlonais

** nd: não detectado

Conclui-se que para o sistema tamponante MMA, as eletroforeses indicaram a presença de uma proteína com massa molecular de aproximadamente 57 kDa nas frações de eluição e de regeneração, porém com muitas impurezas. Comparando-se as diferentes amostras de alimentação (sobrenadante Sf900II - lote A, lisado Sf900II - lote A e lisado TC100 - lote C), observa-se pela eletroforese maior captura de uma proteína de aproximadamente 57 kDa, quando alimentado lisado de células proveniente de cultura em meio TC100, porém os testes ELISA não detectaram presença de GPV nas frações de eluição.

4.1.1.2. Efeito do sistema tamponante fosfato–acetato

No sistema tamponante fosfato-acetato, clássico em IMAC, os íons do sistema tamponante são alterados durante o processo cromatográfico, diferentemente do que ocorre com o sistema tamponante MMA. O tampão fosfato foi utilizado na etapa de adsorção como competidor fraco. Os sais de fosfato apresentam afinidade por íons metálicos por interagirem com estes através da formação de ligações de coordenação.

O fosfato forma complexos de coordenação pouco estáveis com o íon metálico níquel, pois de acordo com Pearson (1968(a) e 1968(b)) esses complexos são resultantes da associação de um ácido e de uma base de caráter diferentes. Segundo a classificação ácido-base de Lewis, o fosfato é classificado como base forte e o íon metálico níquel como ácido intermediário de Lewis e, desta forma, podem ocorrer interações tampão-íon metálico através de ligações de coordenação, o fosfato agindo como um competidor fraco em IMAC e melhorando, em muitos casos, a seletividade de adsorção.

A eluição das proteínas foi realizada por abaixamento de pH, e como o sistema $\text{NaH}_2\text{PO}_3/\text{NaHPO}_4$ tampona na faixa de pH 5,8 a 8,0, a dessorção das proteínas da coluna com este tampão foi realizada somente a pH 6,0, e a valores de pH mais baixos, as proteínas foram eluídas com o tampão acetato de sódio (pH 5,0 e pH 4,0).

Nas cromatografias, utilizou-se sobrenadante de cultura celular e lisado de células em meio TC100, devido à disponibilidade destas amostras. As eletroforeses das cromatografias realizadas com alimentação de sobrenadante de cultura celular indicaram a presença de proteína de aproximadamente 57 kDa nas frações de lavagem, porém, uma pequena quantidade desta proteína presente nas frações de eluição (Figura 4.4 (a)). Para o lisado (Figura 4.4 (b)), a eletroforese indicou a presença da mesma proteína que supõe ser a GPV, nas frações de eluição.

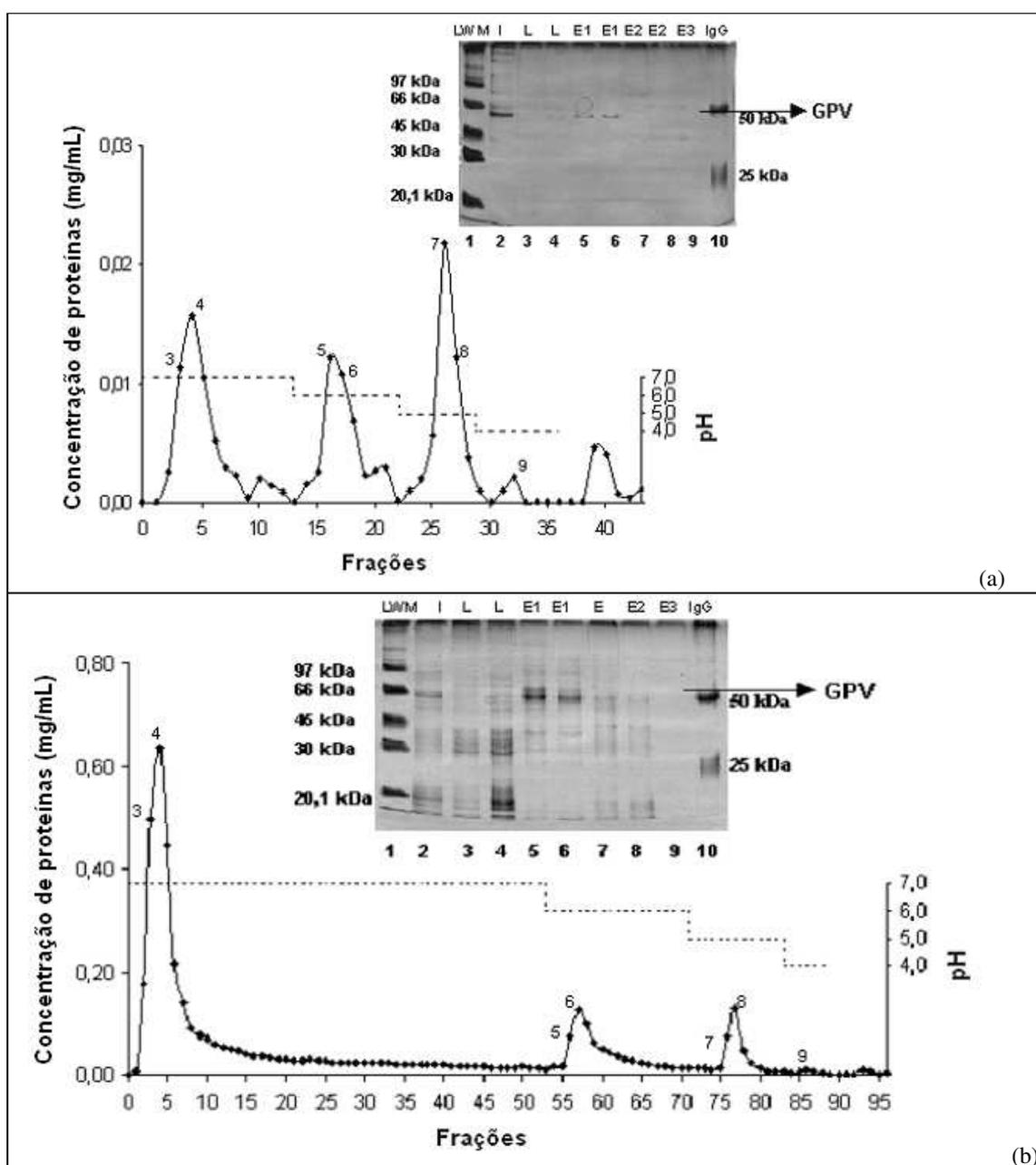


Figura 4.4. Cromatografia de sobrenadante de cultura celular (TC100 – lote C) (a) e do lisado de células (TC100 – lote C) (b) no sistema tamponante fosfato-acetato em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação: 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Adsorção com fosfato 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0; dessorção com tampão fosfato 25 mM, NaCl 1 M pH 6,0, acetato 25 mM, NaCl 1 M pH 5,0 e 4,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7-8. eluição 2 (E2), 9. eluição 3 (E3), 10. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições na eletroforese (a): 2 (2X). Diluições na eletroforese (b): 2 (30X), 3/4 (10X), 6 (2X), 8 (2X). Realizado em duplicata (Apêndice A).

A Tabela 4.5 apresenta o balanço de massa em termos de proteínas totais.

Tabela 4.5. Balanço de massa para proteína total da cromatografia de sobrenadante de cultura celular (TC100) e lisado de células (TC100) em agarose-IDA-Ni²⁺ utilizando o sistema tamponante fosfato-acetato.

Frações	Tipo de Alimentação			
	Sobrenadante (lote C)		Lisado (lote C)	
	(mg) ¹	(%) ²	(mg) ¹	(%) ²
Alimentação	0,39	100,00	11,65	100,00
Lavagem	0,14	35,66	8,57	73,55
Eluição 1	0,11	27,07	1,77	15,17
Eluição 2	0,12	30,13	0,91	7,84
Eluição 3	0,01	2,62	0,10	0,82
Regeneração	0,03	7,00	0,05	0,43
Recuperação	0,40	102,49	11,39	97,81

¹ Massa calculada por meio de dosagem de proteínas totais (Bradford, 1976)

² Porcentagem relativa à massa de proteína total injetada

Observa-se novamente que a maioria das proteínas não foram adsorvidas na coluna cromatográfica, sendo obtidas nas frações de lavagem. Comparando-se os resultados obtidos do teste ELISA, o lisado mostrou maior massa de GPV eluída (Tabela 4.6).

O teste ELISA foi realizado com anticorpos monoclonais e, por isso, uma menor concentração de GPV foi detectada na fração de alimentação em comparação com a encontrada anteriormente, uma vez que os anticorpos monoclonais detectam apenas a forma trimérica da GPV, os policlonais, também detectam os monômeros e os dímeros. Além disso, a competição pelo sítio de adsorção dos anticorpos monoclonais utilizados como primários e secundários pode ter provocado a perda de GPV na etapa de lavagem da placa, resultando em uma menor detecção de GPV.

Tabela 4.6. Concentração de GPV nas frações cromatográficas para sistema tamponante fosfato-acetato e injeção de sobrenadante e lisado (TC100).

Frações	Tipo de Alimentação			
	Sobrenadante (lote C)		Lisado (lote C)	
	Concentração GPV (ng/mL)*	GPV (ng)*	Concentração GPV (ng/mL)*	GPV (ng)*
Alimentação	4,00	20,00	12,75	63,75
Lavagem	4,24	10,60	7,51	18,78
Eluição 1	4,38	10,95	5,95	14,88
Eluição 2	4,62	11,55	5,44	13,60
Eluição 3	-	-	-	-
Regeneração	-	-	-	-

* Teste ELISA realizado com anticorpos monoclonais

Comparando-se o sistema tamponante MMA com fosfato-acetato, pode-se verificar através do ELISA da cromatografia do lisado de células, uma maior quantidade de GPV presente na eluição para o sistema tamponante fosfato-acetato.

4.1.2. Efeito do sistema tamponante e da eluição com adição de agente competitivo na purificação de GPV

4.1.2.1. Sistema tamponante fosfato-imidazol

O sistema tamponante fosfato-imidazol é clássico em IMAC, promovendo altos níveis de purificação de amostras protéicas de diferentes fontes (Wong et al., 1991; Winzerling et al., 1992; Zatloukalová e Kučerová, 2004; Kráčalíková et al., 2006). O agente competitivo imidazol foi utilizado para promover a dessorção das proteínas na etapa de eluição (formação de complexo entre imidazol livre com o metal quelatado) (Sulkowski, 1996). Em IMAC, recomenda-se a eluição com imidazol para purificação de proteínas recombinantes contendo cauda de

polihistidina, uma vez que a forte interação da cauda com o metal quelatado pode ser enfraquecida com concentração de imidazol na faixa de 20 a 500 mM (Lim et al., 2004; Atkins et al., 2005; Gupta et al., 2005). Imidazol em baixa concentração (2 mM) foi adicionado no tampão de adsorção, pois segundo Sulkowski (1996), após a adsorção da proteína na coluna cromatográfica ainda se encontram muitos quelatos livres que, durante a eluição, podem formar complexos com o imidazol perdendo um próton e abaixando o pH na coluna. Quando este fenômeno ocorre, forma-se uma zona de pH muito baixo (de 1 a 2) que precede a dessorção da proteína e assim, a proteína pode ser eluída devido à queda de pH e não devido à adição de imidazol (competição). Para evitar o abaixamento de pH, Sulkowski (1996) recomenda a pré-saturação da coluna com imidazol e a sua adição ao tampão de adsorção, a fim de minimizar a liberação de prótons durante a eluição.

Realizou-se cromatografias para purificação de sobrenadante de cultura celular e lisado de células produzidas em meio TC100, utilizando-se tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 7,0 no equilíbrio da coluna. Na etapa de lavagem utilizou-se tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 6,0, realizando-se a dessorção por aumento de concentração de imidazol para 200 e 500 mM pH 6,0 (Figuras 4.5 e 4.6), procedimento este utilizado por Gupta et al. (2005) para purificar a GPV-his-tag a partir de sobrenadante de cultura celular de "*Madin Darby bovine kidney*" (MDBK). Não se realizou este ensaio para sobrenadante e lisado de células em meio Sf900II devido à indisponibilidade destas amostras.

A Tabela 4.7 apresenta o balanço de massa para proteínas totais. Pode-se observar que uma grande quantidade de proteínas foi eliminada na etapa de lavagem, no lisado em maior quantidade que no sobrenadante. Para o sobrenadante, observa-se na eletroforese (Figura 4.5) uma proteína de aproximadamente 57 kDa nas frações de lavagem e, apenas traços desta proteína nas frações de eluição. Quando o lisado foi alimentado, verifica-se a mesma proteína nas frações de eluição com poucas impurezas presentes (Figura 4.6), demonstrando a seletividade deste sistema tamponante.

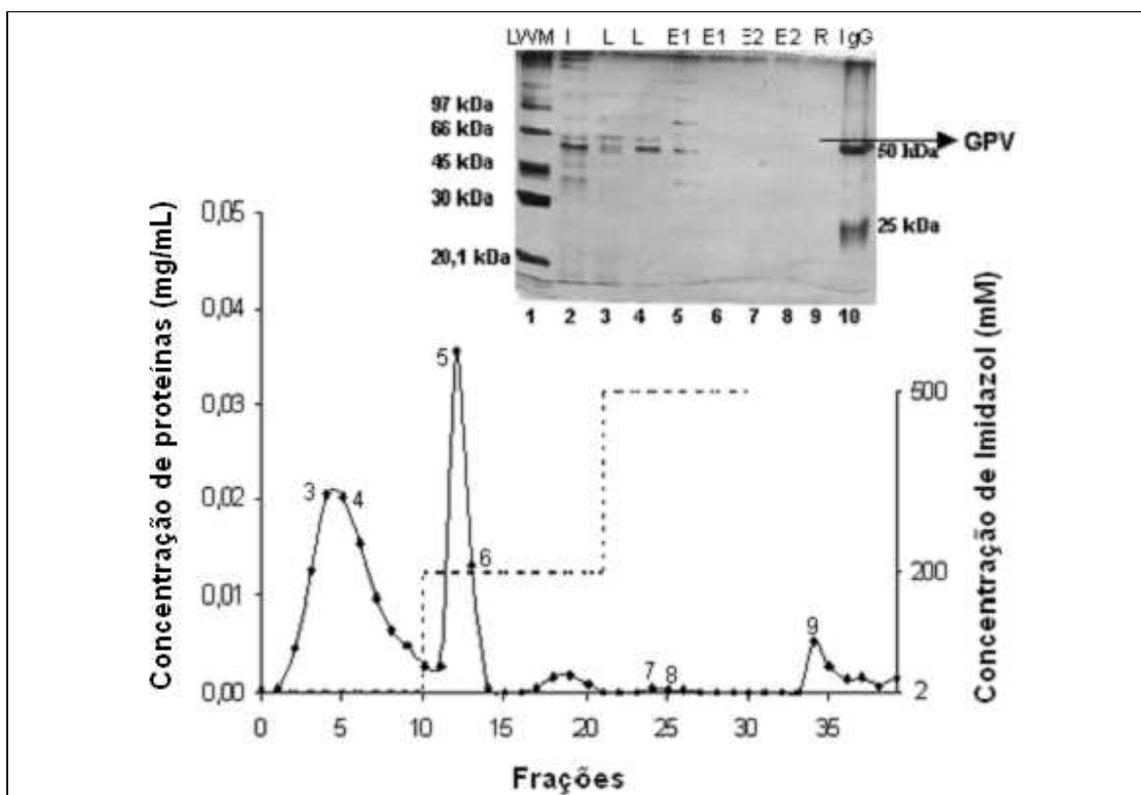


Figura 4.5. Cromatografia de sobrenadante de cultura celular (TC100 – lote C) no sistema tamponante fosfato-imidazol em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Equilíbrio com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 7,0; lavagem com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 6,0; dessorção com tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 200 e 500 mM pH 6,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7-8. eluição 2 (E2), 9. regeneração (R), 10. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições de amostra para a eletroforese: 2 (2X). Realizado em duplicata (Apêndice A).

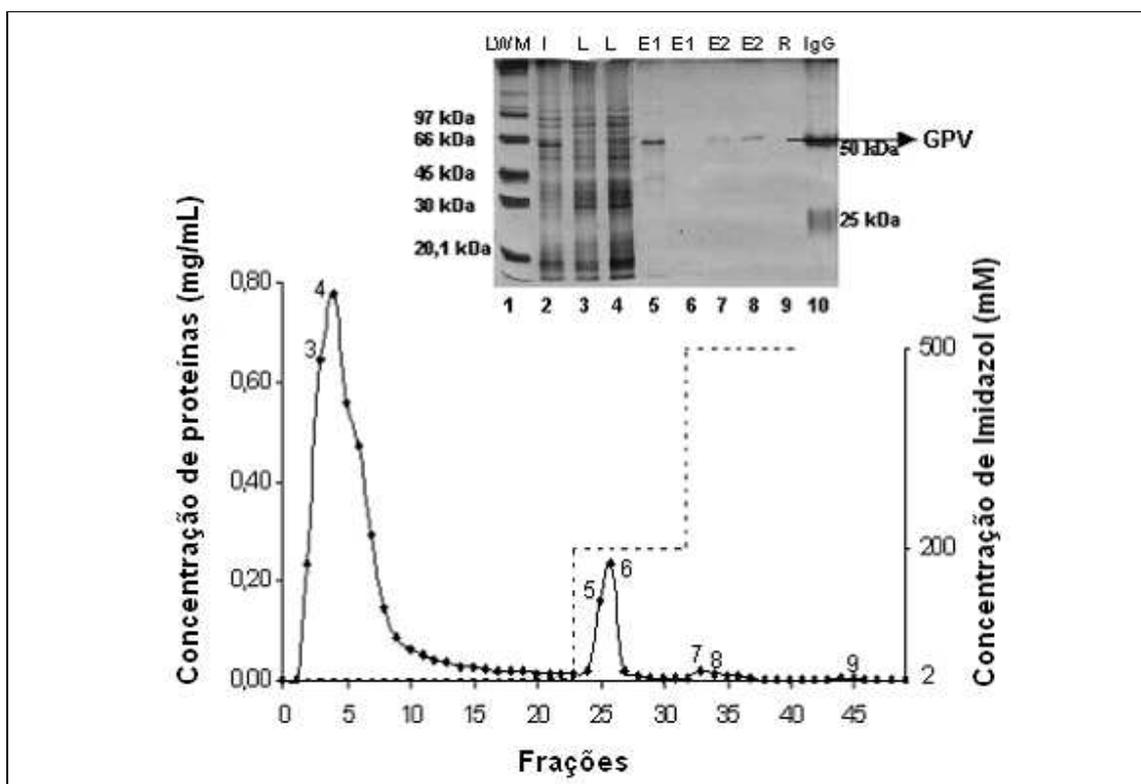


Figura 4.6. Cromatografia de lisado de células (TC100 – lote C) no sistema tamponante fosfato-imidazol em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Equilíbrio com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 7,0; lavagem com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 6,0; dessorção com tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 200 e 500 mM pH 6,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7-8. eluição 2 (E2), 9. regeneração (R), 10. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições de amostras para a eletroforese: 2(30X), 3/4 (10X), 5/6 (4X). Realizado em duplicata (Apêndice A).

Tabela 4.7. Balanço de massa para proteína total da cromatografia em agarose-IDA-Ni²⁺ utilizando o sistema no sistema tamponante fosfato-imidazol. Alimentação de sobrenadante e lisado de células (TC100).

Frações	Tipo de Alimentação			
	Sobrenadante (lote C)		Lisado (lote C)	
	(mg) ¹	(%) ²	(mg) ¹	(%) ²
Alimentação	0,41	100,00	10,69	100,00
Lavagem	0,24	58,10	8,96	83,78
Eluição 1	0,16	39,38	1,17	10,93
Eluição 2	0,00	0,54	0,14	1,33
Regeneração	0,03	14,08	0,01	0,11
Recuperação	0,42	106,21	10,28	96,16

¹ Massa calculada por meio de dosagem de proteínas totais (Bradford, 1976)

² Porcentagem relativa à massa de proteína total injetada

O teste ELISA (Tabela 4.8) mostrou quantidades similares de GPV adsorvida para ambas as soluções de alimentação (lisado e sobrenadante). Devido às baixas concentrações de GPV apresentadas no teste ELISA, tentou-se realizar a concentração das amostras por ultrafiltração, de modo que a leitura do ELISA fosse mais precisa, porém observou-se a agregação de proteínas na amostra concentrada, o que poderia prejudicar a captura da GPV pelos anticorpos utilizados no teste ELISA.

Tabela 4.8. Concentração de GPV nas frações cromatográficas (sistema tamponante fosfato-imidazol) e alimentação de sobrenadante e lisado (TC100).

Frações	Tipo de Alimentação			
	Sobrenadante (lote C)		Lisado (lote C)	
	Concentração GPV (ng/mL)*	GPV (ng)*	Concentração GPV (ng/mL)*	GPV (ng)*
Alimentação	5,50	27,50	17,50	87,50
Lavagem	4,15	10,38	12,80	32,00
Eluição 1	4,90	12,25	6,52	16,30
Eluição 2	-	-	-	-
Regeneração	-	-	-	-

* Teste ELISA realizado com anticorpos monoclonais

Devido aos baixos valores de concentração de GPV detectados pelo teste ELISA nas frações cromatográficas, independente do sistema tamponante utilizado, realizou-se um *western blotting* (Figura 4.7) para confirmar a presença de GPV na fração de eluição e, uma eletroforese nativa (Figura 4.8), para verificar se a forma trimérica da GPV é mantida, uma vez que os anticorpos monoclonais utilizados no teste ELISA detectam a proteína apenas na forma trimérica. Frações cromatográficas do experimento em que se alimentou lisado de células em meio TC100 em uma coluna de agarose-IDA-Ni²⁺ com sistema tamponante fosfato-imidazol foram utilizadas para a realização do *western blotting* e da eletroforese nativa, devido aos bons resultados apresentados por este.

Apesar de na literatura constar que a GPV na forma monomérica possui massa molecular de 65 kDa (Gaudin et al. 1992), observou-se na Figura 4.7 a presença de uma proteína de massa molecular em torno de 57 kDa nas frações cromatográficas, proteína esta que pode, possivelmente, ser a GPV, uma vez não detectada no lisado de células selvagens. Para confirmar se a proteína identificada corresponde realmente à GPV e que a mesma possui 57 kDa, seria necessário sequenciar esta proteína ou realizar um *western blotting* com um anticorpo monoclonal específico que reconheça apenas a GPV, teste este não realizado devido à indisponibilidade deste anticorpo.

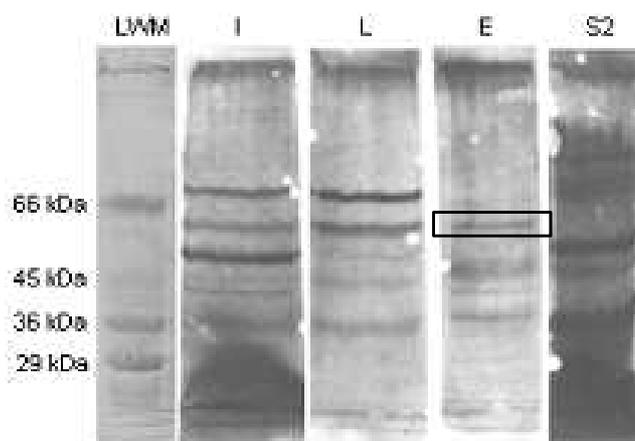


Figura 4.7. Western Blotting. LWM: marcador de baixa massa molecular (Sigma, EUA); I: lisado de células em meio TC 100; L: Lavagem; E: eluição; S2: lisado da célula selvagem.

Através das eletroforeses nativas verifica-se a presença de uma proteína com massa molecular de aproximadamente 170 kDa. Devido ao fato do *western blotting* apontar a possibilidade da proteína com massa molecular em torno de 57 kDa ser GPV, existe uma probabilidade desta proteína verificada na eletroforese nativa ser a GPV na forma trimérica, o que demonstraria que a proteína mantém sua estrutura após a cromatografia, podendo, assim, ser detectada no teste ELISA.

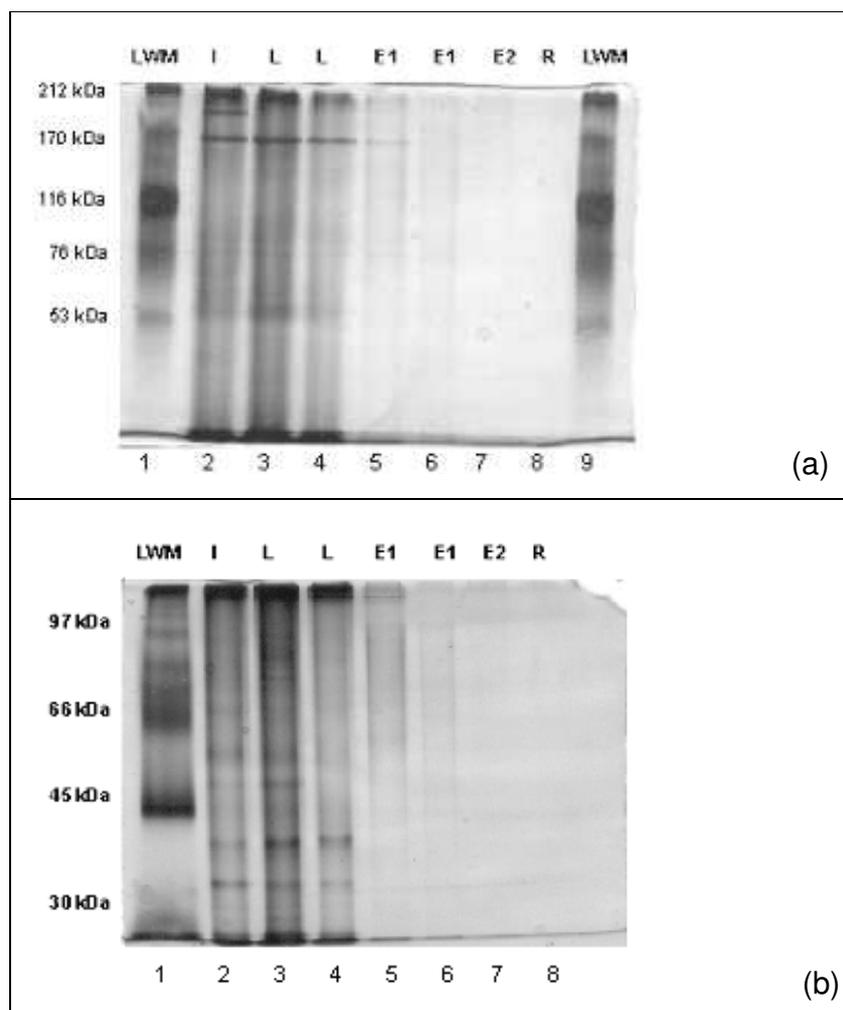


Figura 4.8. Eletroforese nativa de frações cromatográficas obtidas com alimentação de lisado de células (TC100 – lote C) no sistema tamponante fosfato-imidazol em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Equilíbrio com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 7,0; lavagem com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 6,0; dessorção com tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 200 e 500 mM pH 6,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 7,5% (a) e 10% (b) (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7. eluição 2 (E2), 8. regeneração (R), 9. marcador de baixa massa molecular (LWM). Diluições de amostras para as eletroforeses: 2(20X), 3/4 (5X), 5 (2X).

Devido ao fato de, sistematicamente, o sobrenadante de cultura celular apresentar, em relação ao lisado, menor concentração de GPV, e das amostras de sobrenadante e lisado em meio Sf900II não estarem disponíveis, os experimentos subseqüentes em agarose-IDA-Ni²⁺ foram todos realizados apenas com lisado de células em meio TC100.

4.1.2.2. Efeito do sistema tamponante MOPS-imidazol

O sistema MOPS-imidazol também é um sistema tamponante clássico em IMAC (Winzerling et al., 1992; Vançan et al., 2002). Para o estudo do efeito do sistema tamponante MOPS-imidazol na adsorção da GPV, empregou-se na etapa de adsorção MOPS (“Good buffer”) 25 mM contendo 1 M de cloreto de sódio e 2 mM de imidazol a pH 7,0, realizando-se a dessorção por degrau do aumento da concentração de imidazol de 200 e 500 mM (Figura 4.9). Da mesma forma que para o sistema tamponante fosfato-imidazol, o imidazol foi adicionado no tampão de adsorção na concentração de 2 mM, seguindo a recomendação de Sulkowski (1996).

Para o sistema tamponante MOPS-imidazol, alimentando-se lisado de células em meio TC100, a eletroforese indicou a presença da proteína com massa molecular de aproximadamente 57 kDa, equivalente à GPV, nas frações de eluição com boa seletividade, uma vez que se verificou a presença de poucas impurezas, da mesma forma que para o sistema tamponante fosfato-imidazol.

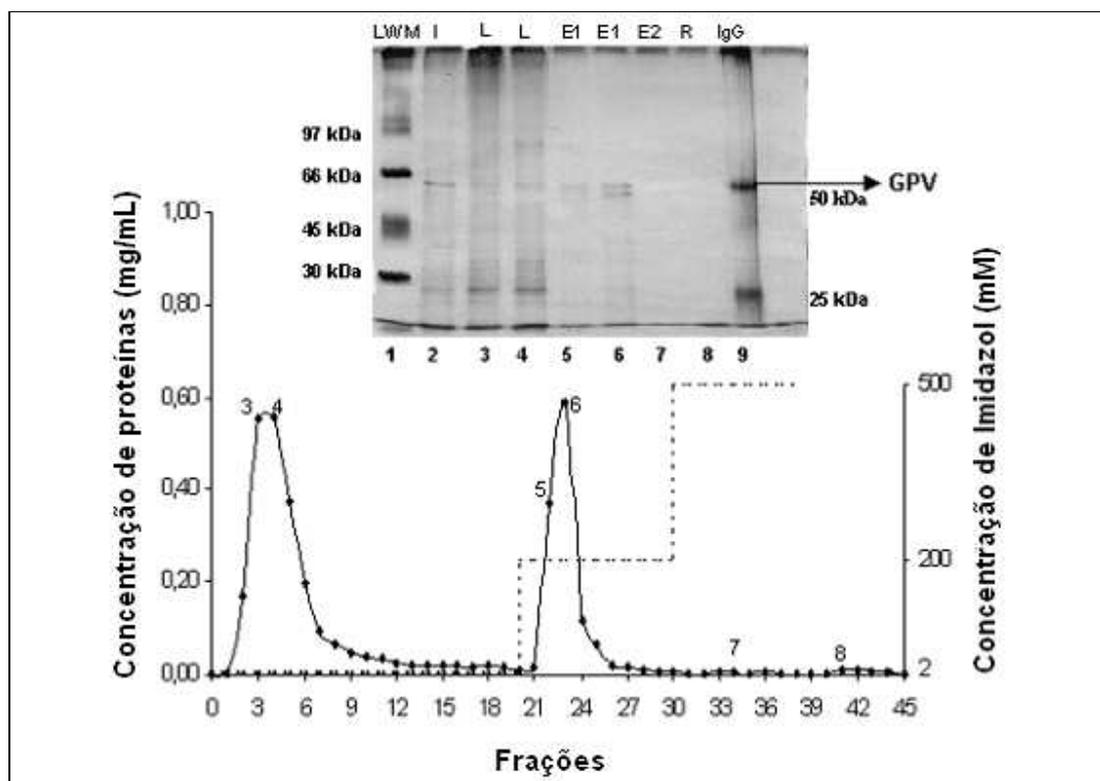


Figura 4.9. Cromatografia de lisado de células (TC100 – lote C) no sistema tamponante em Mops-imidazol em agarose-IDA- Ni^{2+} . Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Adsorção MOPS 25 mM, NaCl 1 M, imidazol 2 mM pH 7,0; desorção com tampão MOPS 25 mM, NaCl 1 M, imidazol 200 e 500 mM pH 7,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7. eluição 2 (E2), 8. regeneração (R), 9. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições na eletroforese: 2(30X), 3/4 (10X), 5/6 (10X).

A Tabela 4.9 apresenta o balanço de massa para proteínas totais, encontrando-se grande quantidade de proteínas na fração de lavagem.

Tabela 4.9. Balanço de massa para proteína total da cromatografia de lisado de células (TC100) em agarose-IDA-Ni²⁺ utilizando o sistema no MOPS-imidazol.

Frações	Tipo de Alimentação	
	Lisado (lote C)	
	(mg) ¹	(%) ²
Alimentação	9,31	100,00
Lavagem	5,69	61,07
Eluição 1	3,03	32,53
Eluição 2	0,06	0,65
Regeneração	0,06	0,64
Recuperação	8,84	94,89

¹ Massa calculada por meio de dosagem de proteínas totais (Bradford, 1976)

² Porcentagem relativa à massa de proteína total injetada

O teste ELISA (Tabela 4.10) detectou GPV nas frações de eluição, porém maior concentração de GPV na fração de lavagem.

Tabela 4.10. Concentração de GPV nas frações cromatográficas para o sistema tamponante MOPS-imidazol e alimentação de lisado (TC100).

Frações	Tipo de Alimentação	
	Lisado (lote C)	
	Concentração GPV (ng/mL)*	GPV (ng)*
Alimentação	59,87	299,35
Lavagem	32,18	80,45
Eluição 1	4,32	10,80
Eluição 2	nd**	-
Regeneração	nd**	-

* Teste ELISA realizado com anticorpos policlonais

** nd: não detectado

4.1.2.3. Efeito do sistema tamponante Tris-HCl

O Tris-HCl não é um tampão clássico em IMAC quando utilizado como agente competidor (dessorção por aumento da concentração de Tris). Tris como agente competidor tem promovido a dessorção seletiva de IgG₁ monoclonal e de IgG humana quando a purificação é feita a partir do sobrenadante de cultura celular de hibridomas e do plasma humano, respectivamente (Serpa et al., 2005; Bresolin, 2006; Ribeiro, 2006).

O Tris apresenta carga positiva em pH 7,0, uma vez que apresenta pKa de 8,3. Apesar do grupo NH₃⁺ carregado, este possui um par de elétrons disponível para formar ligação de coordenação com íons metálicos. O tampão Tris-HCl age como agente competidor em IMAC, promovendo seletividade de adsorção de proteínas. O tampão Tris-HCl foi empregado na concentração de 25 mM a pH 7,0, e a dessorção foi efetuada por degrau de aumento da concentração de Tris-HCl (100, 300, 500 e 700 mM) a pH 7,0.

A Figura 4.10 apresenta o cromatograma e eletroforese quando utilizado este sistema tamponante. A eletroforese indicou a presença da proteína de aproximadamente 57 kDa nas frações de eluição, porém com maior quantidade de impurezas do que no sistema tamponante fosfato-imidazol. A Tabela 4.11 apresenta o balanço de massa para proteínas totais, onde se verifica novamente uma grande quantidade de proteínas sendo retirada na etapa de lavagem.

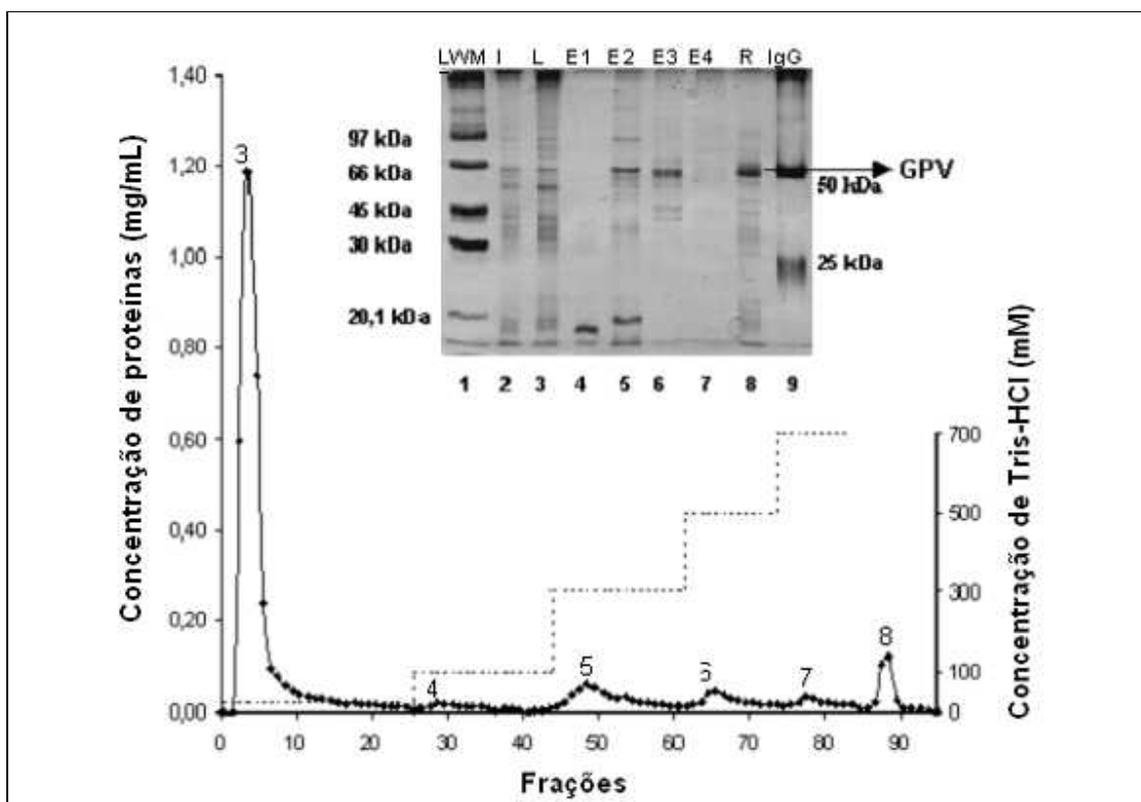


Figura 4.10. Cromatografia de lisado de células (TC100 – lote C) no sistema tamponante Tris-HCl em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Adsorção com Tris-HCl 25 mM pH 7,0; dessorção com tampão Tris-HCl a 100, 300, 500 e 700 mM pH 7,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3. lavagem (L), 4. eluição 1 (E1), 5. eluição 2 (E2), 6. eluição 3 (E3), 7. eluição 4 (E4), 8. regeneração (R), 9. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições na eletroforese: 2 (50X), 3 (20X), 8 (2X). Realizado em duplicata (Apêndice A).

Tabela 4.11. Balanço de massa para proteína total da cromatografia de lisado de células (TC100) em agarose-IDA-Ni²⁺ utilizando o sistema tamponante Tris-HCl.

Frações	Tipo de Alimentação	
	Lisado (lote C)	
	(mg) ¹	(%) ²
Alimentação	13,51	100,00
Lavagem	8,38	62,00
Eluição 1	0,40	2,99
Eluição 2	1,29	9,51
Eluição 3	0,80	5,90
Eluição 4	0,52	3,84
Regeneração	0,80	5,89
Recuperação	12,18	90,14

¹ Massa calculada por meio de dosagem de proteínas totais (Bradford, 1976)

² Porcentagem relativa à massa de proteína total injetada

O teste ELISA mostrou maior concentração de GPV na fração de eluição do que nas frações de lavagem (Tabela 4.12). Percebe-se uma baixa concentração de GPV na fração de alimentação de lisado, provocado ou por interferência do tampão no resultado do ELISA, por precipitação de proteínas ou pelo fato da concentração de GPV nas amostras analisadas estar muito abaixo da concentração adequada para a realização do teste ELISA (25 ng/mL).

Tabela 4.12. Concentração de GPV nas frações cromatográficas para o sistema tamponante Tris-HCl e alimentação de lisado (TC100).

Frações	Tipo de Alimentação	
	Lisado (lote C)	
	Concentração GPV (ng/mL)*	GPV (ng)*
Alimentação	5,44	27,20
Lavagem	2,65	6,63
Eluição 1	3,13	7,83
Eluição 2	3,13	7,83
Eluição 3	nd**	-
Eluição 4	2,65	6,63
Regeneração	nd**	-

* Teste ELISA realizado com anticorpos monoclonais

** nd: não detectado

Para todos os sistemas tamponantes utilizados na tentativa de purificação da GPV em agarose-IDA-Ni²⁺ observa-se pelas eletroforeses a presença da proteína de massa molecular de aproximadamente 57 kDa, supostamente a GPV, nas frações de lavagem, confirmado pelo teste ELISA (Tabelas 4.13 e 4.14), indicando que a GPV não está sendo totalmente adsorvida na coluna cromatográfica.

Tabela 4.13. Concentração de GPV nas frações cromatográficas para o sistema tamponante MMA com alimentação de sobrenadante (S) e lisado (L) (Sf900II – lote A) e lisado (L) (TC100 – lote C), e para o sistema tamponante fosfato-acetato com alimentação de lisado (L) (TC100-lote C).

Frações	Tipo de Alimentação					
	Concentração GPV (ng/mL) [*]				Concentração GPV (ng/mL) ^{**}	
	S (lote A)	L (lote A)	L (lote C) ¹	L (lote C) ²	S (lote C) ³	L (lote C) ³
Alimentação	25,20	44,87	52,56	60,99	4,00	12,75
Lavagem	nd ^{***}	nd ^{***}	4,61	2,87	4,24	7,51
Eluição 1	nd ^{***}	nd ^{***}	0,69	nd ^{***}	4,38	5,95
Eluição 2	-	-	-	nd ^{***}	4,62	5,44
Eluição 3	-	-	-	nd ^{***}	-	-
Regeneração	nd ^{***}	nd ^{***}	nd ^{***}	nd ^{***}	-	-

¹ Sistema tamponante MMA, dessorção por diminuição de pH para 4,0 (Eluição 1)

² Sistema tamponante MMA, dessorção por diminuição de pH para 6,0 (Eluição 1), 5,0 (Eluição 2), 4,0 (Eluição 3)

³ Sistema tamponante fosfato-acetato, dessorção por diminuição de pH para 6,0 (Eluição 1), 5,0 (Eluição 2), 4,0 (Eluição 3)

* Teste ELISA realizado com anticorpos policlonais

** Teste ELISA realizado com anticorpos monoclonais

*** nd: não detectado

Tabela 4.14. Concentração de GPV nas frações cromatográficas para o sistema tamponante fosfato-imidazol com alimentação de sobrenadante (S) e lisado (L) (TC100 – lote C), para o sistema tamponante Tris-HCl e MOPS-imidazol com alimentação de lisado (L) (TC100-lote C).

Frações	Tipo de Alimentação			
	Concentração GPV (ng/mL)**			Concentração GPV (ng/mL)*
	S (lote C) ¹	L (lote C) ¹	L (lote C) ²	L (lote C) ³
Alimentação	5,50	17,50	5,44	59,87
Lavagem	4,15	12,80	2,65	32,18
Eluição 1	4,90	6,52	3,13	4,32
Eluição 2	-	-	3,13	nd***
Eluição 3	-	-	nd***	-
Eluição 3	-	-	2,65	-
Regeneração	-	-	nd***	nd***

¹ Sistema tamponante fosfato-imidazol e dessorção por aumento da concentração de imidazol para 200 mM (Eluição 1) e 500 mM (Eluição 2).

² Sistema tamponante Tris-HCl, dessorção por aumento da concentração de Tris-HCl para 100 mM (Eluição 1), 300 mM (Eluição 2), 500 mM (Eluição 3) e 700 mM (Eluição 4).

³ Sistema tamponante MOPS-imidazol, dessorção por aumento da concentração de imidazol para 200 mM (Eluição 1) e 500 mM (Eluição 2).

* Teste ELISA realizado com anticorpos policlonais

** Teste ELISA realizado com anticorpos monoclonais

*** nd: não detectado

4.2. ADSORÇÃO DE GPV A PARTIR DO LISADO DE CÉLULAS EM AGAROSE-IDA-Cu²⁺

Tendo-se constatado a baixa eficácia de captura de GPV do adsorvente agarose-IDA-Ni²⁺ em todos os sistemas tamponantes empregados, propôs-se a substituição do íon níquel por cobre. O íon metálico cobre foi selecionado com base nos estudos de Sulkowski (1989), que demonstrou que a força de retenção em IMAC de proteínas com histidinas acessíveis seguia a seguinte ordem: Cu²⁺ > Ni²⁺ > Zn²⁺ = Co²⁺. Além da alta força de retenção de proteínas, pode-se citar

como exemplo, o trabalho de Boulis et al. (2003), que purificaram esporamina recombinante a homogeneidade em cobre imobilizado. Assim, o gel agarose-IDA-Cu²⁺ foi utilizado com o intuito de melhorar a captura de GPV. O sistema tamponante empregado foi fosfato-imidazol, uma vez que promoveu melhor seletividade para o sistema agarose-IDA-Ni²⁺. O cromatograma e eletroforese da purificação de GPV em agarose-IDA-Cu²⁺ estão apresentados na Figura 4.11.

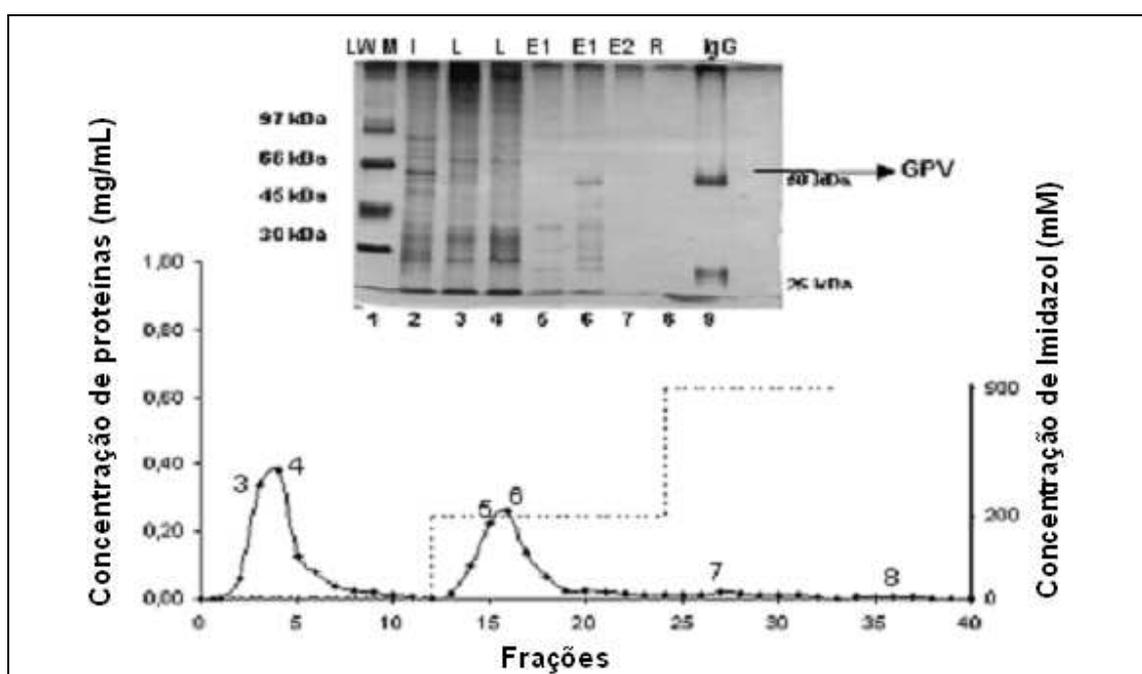


Figura 4.11. Cromatografia de lisado de células (TC100 – lote C) no sistema tamponante fosfato-imidazol em agarose-IDA-Cu²⁺. Alimentação 3,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Equilíbrio com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 7,0; lavagem com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 6,0; dessorção com tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 200 e 500 mM pH 6,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7. eluição 2 (E2), 8. regeneração (R), 9. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições de amostras para a eletroforese: 2(20X), 3/4 (5X), 5/6 (2X).

A eletroforese mostrou a presença de uma proteína com a massa molecular de aproximadamente 57 kDa na fração de eluição, porém com menor seletividade que em agarose-IDA-Ni²⁺ para o mesmo sistema tamponante. Considerando-se o balanço de massa (Tabela 4.15) para o sistema agarose-IDA-Cu²⁺, nota-se uma maior captura de proteínas totais quando o íon cobre é utilizado, com menor quantidade de proteínas sendo eliminadas na etapa de lavagem.

Tabela 4.15. Balanço de massa para proteína total da cromatografia em agarose-IDA-Cu²⁺ utilizando o sistema tamponante fosfato-imidazol. Alimentação de lisado de células (TC100).

Frações	Tipo de Alimentação	
	Lisado (lote C)	
	(mg) ¹	(%) ²
Alimentação	3,68	100,00
Lavagem	1,63	44,14
Eluição 1	1,33	36,17
Eluição 2	0,13	3,50
Regeneração	0,03	0,70
Recuperação	3,11	84,51

¹ Massa calculada por meio de dosagem de proteínas totais (Bradford, 1976)

² Porcentagem relativa à massa de proteína total injetada

Este resultado é típico de cromatografias realizadas com o íon metálico cobre imobilizado (alta captura e baixa seletividade). Apesar disso, o teste ELISA (Tabela 4.16) detectou quantidade similar de GPV nas frações de lavagem e menor quantidade de GPV na fração de eluição quando comparado ao adsorvente agarose-IDA-Ni²⁺.

Tabela 4.16. Concentração de GPV nas frações cromatográficas para o sistema tamponante fosfato-imidazol e alimentação de lisado (TC100).

Frações	Tipo de Alimentação	
	Lisado (lote C)	
	Concentração GPV (ng/mL)*	GPV (ng)*
Alimentação	28,95	86,85
Lavagem	24,32	36,48
Eluição 1	1,70	2,55
Eluição 2	1,27	1,91
Regeneração	nd**	-

* Teste ELISA realizado com anticorpos policlonais

** nd: não detectado

Pelo fato da GPV supostamente conter uma cauda com seis histidinas, esperava-se uma forte adsorção em agarose-IDA-Cu²⁺, o que não ocorreu. Pode-se explicar a baixa adsorção de GPV em agarose-IDA-Cu²⁺ através de duas hipóteses. Uma seria adsorção competitiva entre a GPV e proteínas contaminantes contendo resíduos de histidina acessíveis presentes no lisado, uma vez que a presença de pelo menos um resíduo de histidina disponível para a coordenação resulta na retenção da uma proteína em um gel de IDA-Cu²⁺. Como a GPV está em baixa concentração (ng/mL) na solução e é uma proteína de alta massa molecular quando na sua forma trimérica, a adsorção seria dificultada devido a fatores estéricos, e, no caso de competição de proteínas menores pelos sítios de adsorção, a GPV estaria em desvantagem. Outra hipótese seria de parte da GPV produzida no lisado não apresentar a cauda de histidina acessível, e a sua adsorção em agarose-IDA-Me²⁺, portanto, ser ineficiente.

Aquino et al. (2006) também obtiveram menor adsorção de pró-insulina com cauda de polihistidina em agarose-IDA-Cu²⁺ quando comparado a agarose-IDA-Ni²⁺. No entanto, a baixa adsorção de proinsulina em cobre imobilizado foi devido à natureza da amostra utilizada, que continha agentes redutores e peróxidos provenientes da solubilização de corpos de inclusão e da sulfitólise,

constituintes que possivelmente ocasionaram reações oxidativas na presença íon cobre, provocando perda parcial dos resíduos de histidina disponíveis da superfície da proinsulina e impedindo a interação proteína-metal.

4.3. CONCENTRAÇÃO DE GPV: PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

A precipitação de biomoléculas com adição de sais é uma técnica muito utilizada em processos de recuperação e purificação de bioprodutos por promover a concentração do material de interesse e, em muitos casos, eliminar parte das impurezas e contaminantes da amostra. Dentre os diversos agentes de precipitação está o sulfato de amônio, que aumenta o efeito hidrofóbico na solução, promove a agregação das proteínas e pode ser usado em etapa inicial para separação de proteínas (Ersson et al., 1989; Shih et al., 1992). Com o intuito de concentrar a GPV na solução, foram realizadas precipitações da solução de lisado de células com concentrações de sulfato de amônio de 40%, 50%, 60% e 70%, uma vez observada a agregação de proteínas e a retenção destas proteínas na membrana quando se tentou concentrar a GPV por ultrafiltração.

A adição de sulfato de amônio no lisado não foi eficiente para precipitar a GPV, como pode ser observado na eletroforese (Figura 4.12) e nos resultados do teste ELISA (Tabela 4.17). Nota-se a presença de uma proteína de massa molecular de aproximadamente 57 kDa em todos os sobrenadantes, sendo que a fração mais pura foi obtida para a razão de 40% lisado, 60% solução de sulfato de amônio.

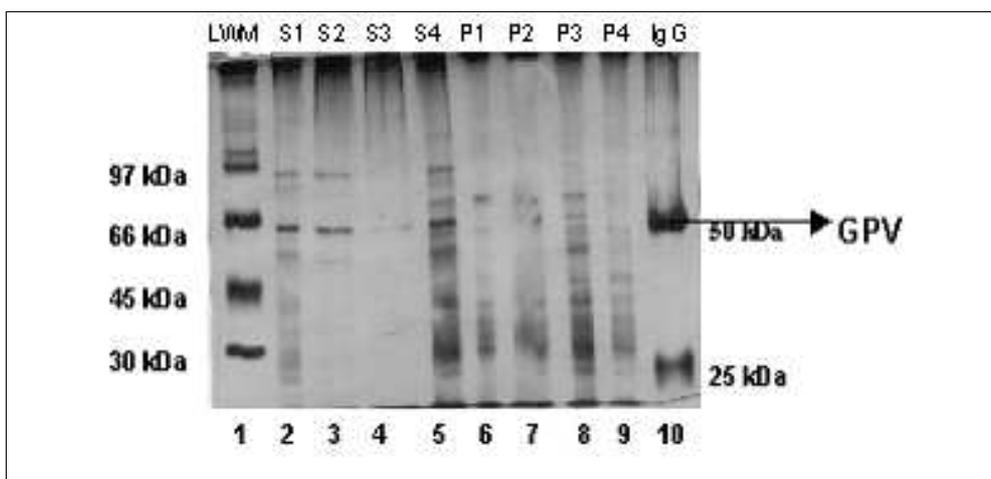


Figura 4.12. Eletroforese do sobrenadante e precipitado, obtidos na precipitação de lisado de células em meio TC100 por adição de sulfato de amônio em diferentes concentrações (40%, 50%, 60% e 70%). Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. sobrenadante (50% lisado, 50% sulfato de amônio) (S1), 3. sobrenadante (40% lisado, 60% sulfato de amônio) (S2), 4. sobrenadante (30% lisado, 70% sulfato de amônio) (S3), 5. sobrenadante (60% lisado, 40% sulfato de amônio) (S4), 6. precipitado (50% lisado, 50% sulfato de amônio) (P1), 7. precipitado (40% lisado, 60% sulfato de amônio) (P2), 8. precipitado (30% lisado, 70% sulfato de amônio) (P3), 9. precipitado (60% lisado, 40% sulfato de amônio) (P4), 10. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições de amostras para a eletroforese: 2(10X), 3 (5X), 4 (3X), 5 (10X), 6/7/8/9 (50X).

Tabela 4.17. Concentração de GPV nas amostras de sobrenadante e precipitado obtidas na precipitação de lisado (TC100) com sulfato de amônio.

Frações	Precipitação	
	Concentração GPV (ng/mL)*	GPV (ng)*
Lisado (lote C)	19,64	78,56
Sobrenadante 1	4,30	17,20
Sobrenadante 2	nd**	-
Sobrenadante 3	nd**	-
Sobrenadante 4	8,48	33,92
Precipitado 1	2,82	2,82
Precipitado 2	5,38	5,38
Precipitado 3	5,92	5,92
Precipitado 4	6,86	6,86

* Teste ELISA realizado com anticorpos policlonais

** nd: não detectado

1: 50% lisado, 50% sulfato de amônio.

2: 40% lisado, 60% sulfato de amônio.

3: 30% lisado, 70% sulfato de amônio.

4: 60% lisado, 40% sulfato de amônio.

Tendo o teste ELISA mostrado maior quantidade de GPV no sobrenadante da precipitação que no precipitado, o objetivo inicial de concentrar o material não foi atingido. Além disso, em termos de concentração, a GPV se encontrava mais concentrada na solução inicial (antes da precipitação) do que no sobrenadante da precipitação. Quando adicionado 60% de sulfato de amônio no lisado, obteve-se um sobrenadante (sobrenadante 2), contendo uma proteína de massa molecular similar à da GPV com poucas impurezas (Figura 4.12), no entanto, o teste ELISA não acusou a presença de GPV neste sobrenadante.

4.4. ADSORÇÃO DE GPV A PARTIR DO LISADO DE CÉLULAS: COMPARAÇÃO ENTRE GEL AGAROSE-IDA-Ni²⁺ E ADSORVENTES COMERCIAIS

O desempenho do gel agarose-IDA-Ni²⁺ sintetizado para adsorção de GPV a partir do lisado de células foi comparado com géis comerciais. Para tanto, foram escolhidos dois adsorventes:

- a) O gel agarose com níquel imobilizado em um agente quelante não divulgado pelo fabricante, da marca Amersham Biosciences (coluna Histrap). Esta escolha fundamentou-se no fato do fabricante recomendar a utilização deste gel para a purificação de proteínas recombinantes contendo cauda de polihistidina;
- b) O gel agarose-concanavalina A (Sigma, EUA). A escolha deste adsorvente foi fundamentada em dados publicados por Perez et al. (1998), que utilizaram este adsorvente para purificação da GPV proveniente de vírus da raiva que infecta peixes.

4.4.1. Adsorção de GPV em coluna Histrap

Os ensaios com a coluna Histrap foram conduzidos em dois sistemas tamponantes: a) Equilíbrio com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 7,0, lavagem com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 6,0 e dessorção por aumento de concentração de imidazol para 200 e 500 mM pH 6,0, melhor resultado encontrado utilizando-se agarose-IDA-Ni²⁺ sintetizado; b) Sistema tamponante indicado pelo fabricante da coluna Histrap (fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM pH 7,4 com dessorção por aumento da concentração de imidazol para 100, 300 e 500 mM pH 7,4.

Os cromatogramas e as eletroforeses estão apresentados nas Figuras 4.13 e 4.14. A Tabela 4.18 apresenta os balanços de massa para proteínas totais.

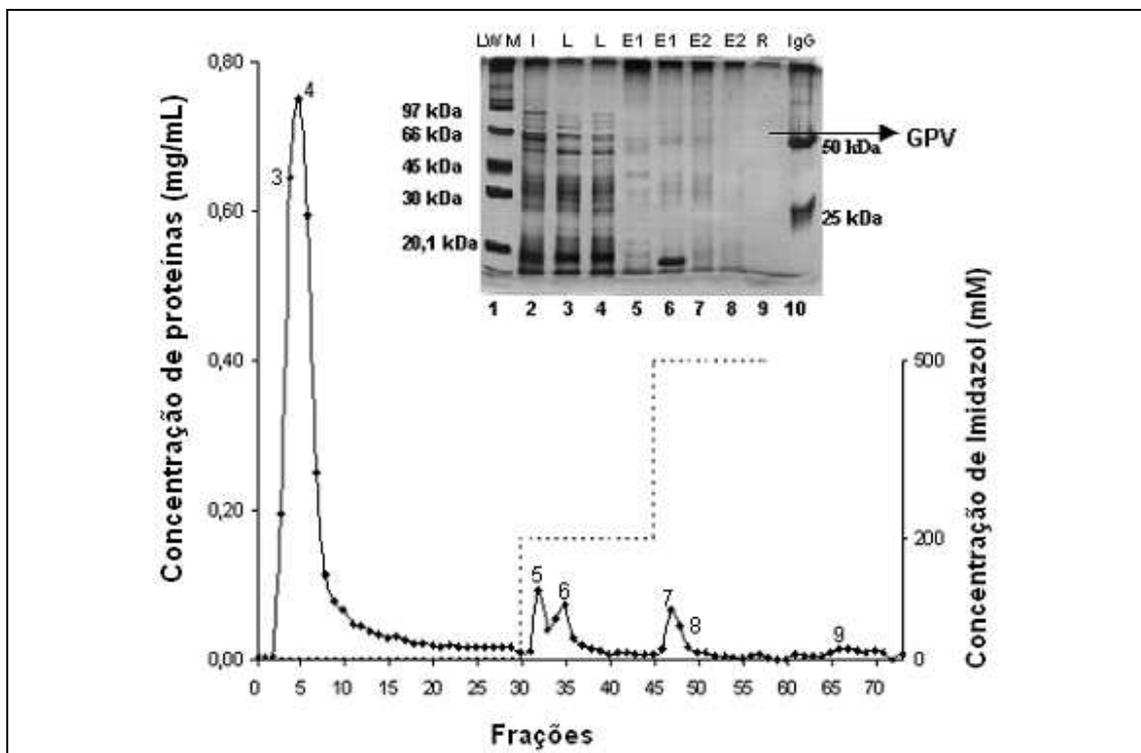


Figura 4.13. Cromatografia em coluna Histrap de lisado de cultura celular (TC 100) no sistema tamponante fosfato-imidazol. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Equilíbrio com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 7,0; lavagem com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 6,0; dessorção com tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 200 e 500 mM pH 6,0 e regeneração com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7-8. eluição 2 (E2), 9. regeneração (R), 10. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições de amostras para a eletroforese: 2(20X), 3/4 (10X). Realizado em duplicata (Apêndice A).

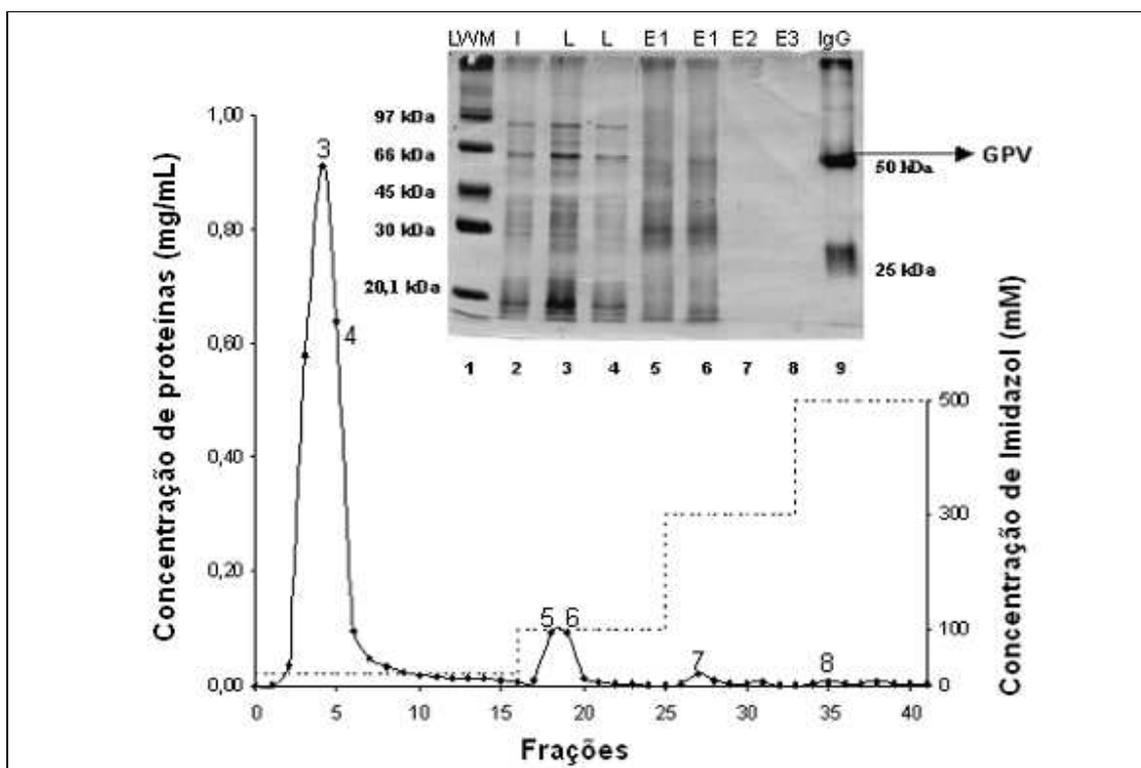


Figura 4.14. Cromatografia em coluna Histrap de lisado de cultura celular (TC 100) no sistema tamponante fosfato-imidazol. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Adsorção com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM pH 7,4 e dessorção por aumento de concentração de imidazol 100, 300 e 500 mM. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7. eluição 2 (E2), 8. eluição 3 (E3), 9. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições de amostras para a eletroforese: 2(20X), 3/4 (10X). Realizado em duplicata (Apêndice A).

Tabela 4.18. Balanço de massa para proteína total da cromatografia em coluna Histrap. Alimentação de lisado de células (TC100).

Frações	Tipo de Alimentação			
	Lisado (lote C) ¹		Lisado (lote C) ²	
	(mg) ³	(%) ⁴	(mg) ³	(%) ⁴
Alimentação	10,99	100,00	8,69	100,00
Lavagem	7,89	71,81	6,10	70,20
Eluição 1	0,99	9,03	0,56	6,48
Eluição 2	0,50	4,50	0,12	1,35
Eluição 3	-	-	0,08	0,90
Regeneração	0,28	2,53	-	-
Recuperação	9,65	87,88	6,86	78,93

¹ Sistema tamponante fosfato-imidazol pH 6,0, dessorção por aumento da concentração de imidazol para 200 mM (Eluição 1) e 500 mM (Eluição 2)

² Sistema tamponante fosfato-imidazol pH 7,4, dessorção por aumento de concentração de imidazol 100 mM (Eluição 1), 300 mM (Eluição 2) e 500 mM (Eluição 3)

³ Massa calculada por meio de dosagem de proteínas totais (Bradford, 1976)

⁴ Porcentagem relativa à massa de proteína total injetada

As eletroforeses, para ambos experimentos, indicaram a presença de uma proteína de aproximadamente 57 kDa nas frações de lavagem e também na eluição, porém com maior quantidade de impurezas que o observado em agarose-IDA-Ni²⁺ para o mesmo sistema tamponante. Contrariamente à eletroforese, o teste ELISA (Tabela 4.19) não detectou a presença de GPV nas frações de lavagem quando empregado o sistema tamponante fosfato-imidazol a pH 6,0, possivelmente devido a erros na detecção de GPV. O teste ELISA mostrou maior concentração de GPV nas frações de eluição para o sistema tamponante a pH 6,0, comparado ao adsorvente agarose-IDA-Ni²⁺. Porém, para as cromatografias realizadas nas condições sugeridas pelo fabricante, o teste acusou quantidades de GPV na fração de eluição similares ao adsorvente agarose-IDA-Ni²⁺.

Devido à similaridade de resultados no balanço de massa e na eletroforese para as duas cromatografias realizadas, supõe-se um possível erro na

detecção de GPV por ELISA na fração de lavagem da cromatografia realizada utilizando sistema tamponante a pH 6,0.

Tabela 4.19. Concentração de GPV nas frações cromatográficas do lisado de células (TC100) em coluna Histrap.

Frações	Tipo de Alimentação			
	Lisado (lote C) ¹		Lisado (lote C) ²	
	Concentração GPV (ng/mL)*	GPV (ng)*	Concentração GPV (ng/mL)*	GPV (ng)*
Alimentação	17,00	85,00	17,00	85,00
Lavagem	nd**	-	6,15	15,38
Eluição 1	6,35	15,88	4,80	12,00
Eluição 2	7,92	19,80	nd**	-
Eluição 3	-	-	-	-
Regeneração	-	-	-	-

¹ Sistema tamponante fosfato-imidazol pH 6,0, dessorção por aumento da concentração de imidazol para 200 mM (Eluição 1) e 500 mM (Eluição 2)

² Sistema tamponante fosfato-imidazol pH 7,4, dessorção por aumento de concentração de imidazol 100 mM (Eluição 1), 300 mM (Eluição 2) e 500 mM (Eluição 3)

* Teste ELISA realizado com anticorpos monoclonais

** nd: não detectado

Portanto, a coluna Histrap não mostrou vantagens em relação ao adsorvente agarose-IDA-Ni²⁺ para o mesmo sistema tamponante. Analisou-se, então, a adsorção de GPV por cromatografia de afinidade com concanavalina A imobilizada.

4.4.2. Adsorção de GPV em agarose-Concanavalina A

As lectinas, proteínas de origem não imunológica, são classificadas como ligantes bioespecíficos com especificidade de grupo e se ligam reversivelmente à vários tipos de glicoproteínas, dependendo de suas especificidades (Carlsson et al., 1989). As moléculas de lectinas apresentam dois ou mais sítios de ligação a carboidratos (mono ou oligossacarídeos) e, devido à esta habilidade, são empregadas como ligantes em cromatografia de afinidade. A Con A (massa molecular de 106 kDa), lectina isolada de sementes da planta *Canavalia ensiformis*, apresenta afinidade por α -D-glicose e α -D-manose.

Perez et al. (1998) exploraram a presença de carboidratos na molécula de glicoproteína G do vírus da raiva que infecta peixes para purificá-la por cromatografia de afinidade com concanavalina A imobilizada. Devido aos bons resultados apresentados por Perez et al. (1998) em termos de pureza e recuperação de GPV através desta cromatografia (purificação em uma única etapa conservando a atividade da GPV), realizou-se, neste trabalho, um estudo com Con A imobilizada alimentando-se lisado de células. Para a realização deste experimento, utilizou-se lisado de células produzido em meio TC 100, devido à indisponibilidade de lisado de células produzido em meio Sf900 II. Obteve-se o cromatograma e eletroforese apresentada na Figura 4.15. A Tabela 4.20 apresenta o balanço de massa para proteínas totais.

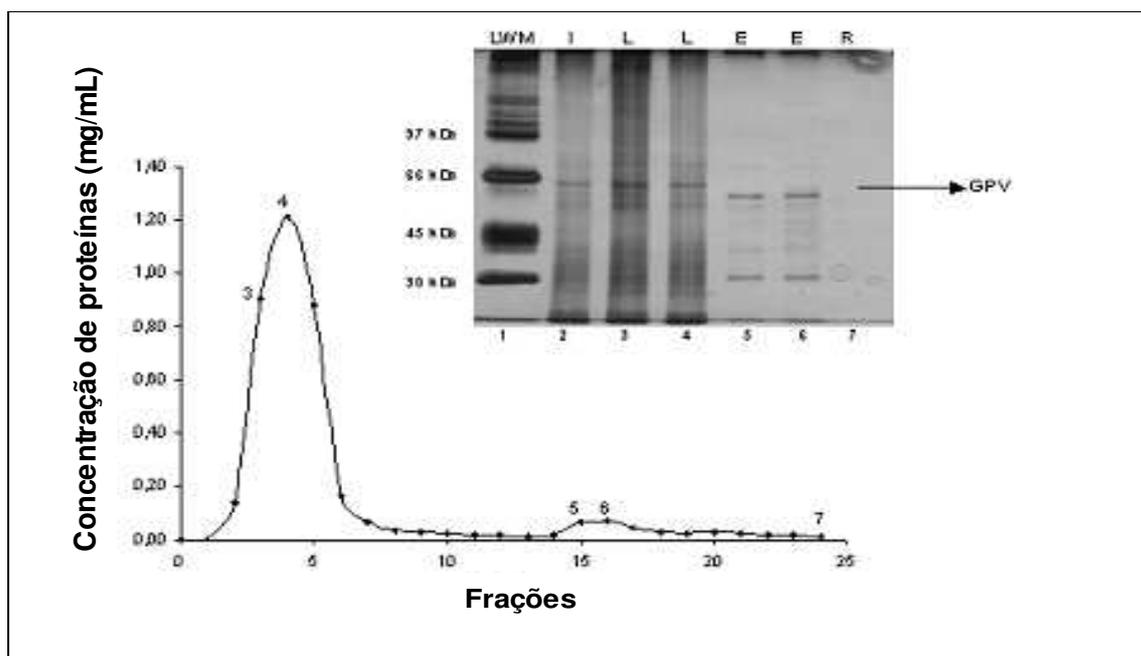


Figura 4.15. Cromatografia de lisado de células (TC 100 – lote C) em agarose-Con A. Alimentação 3,0 mL. Vazão 0,3 mL/min. Adsorção com Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, $MnCl_2$ e $CaCl_2$ 1 mM pH 7,4 e dessorção com tampão em Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, metil- α -D-glucopiranosídeo 0,5 M pH 7,4. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição (E), 7. regeneração (R). Diluições de amostras para a eletroforese: 2 (20x), 3 (10x), 4 (15x).

Tabela 4.20. Balanço de massa para proteína total da cromatografia em agarose-Con A com alimentação de lisado de células (TC 100).

Frações	Tipo de Alimentação	
	Lisado (lote C)	
	(mg) ¹	(%) ²
Alimentação	5,49	100,00
Lavagem	5,20	94,75
Eluição	0,51	9,21
Regeneração	0,13	2,38
Recuperação	5,84	106,33

¹ Massa calculada por meio de dosagem de proteínas totais (Bradford, 1976)

² Porcentagem relativa à massa de proteína total injetada

Na cromatografia de afinidade com Con A imobilizada com alimentação de lisado de células a GPV provavelmente não foi adsorvida, uma vez que a proteína de massa molecular de aproximadamente 57 kDa não foi observada na fração de eluição. É possível que a GPV obtida a partir de células de inseto de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 modificadas geneticamente (S2AcGPV2) não apresente α -D-glicose e α -D-manose ou que estes não estejam acessíveis ao ligante, dificultando a adsorção da GPV no gel agarose-Con A. Portanto, comparando-se com o gel de agarose-IDA-Ni²⁺, conclui-se que o IMAC proporcionou melhor adsorção de GPV, quando utilizado com sistema tamponante fosfato-imidazol, do que a agarose-Con A. Além disso, o gel de agarose-Con A é de difícil regeneração, podendo-se reutilizar o gel poucas vezes, o que aumenta custos de processo quando comparado ao gel de IMAC.

O teste ELISA (Tabela 4.21) mostrou GPV apenas na fração de lavagem, confirmando que a GPV não foi adsorvida no gel agarose-Con A.

Tabela 4.21. Concentração de GPV nas frações cromatográficas do lisado de células (TC 100) em agarose-Con A.

Frações	Tipo de Alimentação	
	Lisado (lote C)	
	Concentração GPV (ng/mL)*	GPV (ng)*
Alimentação	17,38	52,14
Lavagem	7,02	10,53
Eluição	nd**	-
Regeneração	nd**	-

* Teste ELISA realizado com anticorpos policlonais

** nd: não detectado

5. CONCLUSÕES

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados foi utilizada neste trabalho para a purificação da glicoproteína G do vírus da raiva (GPV) recombinante expressa por células de *Drosophila melanogaster* Schneider S2 modificadas geneticamente, a partir de sobrenadante de cultura celular e de lisado de células produzidos em meio Sf900II e TC100.

Verificou-se que o sistema tamponante tem influência na adsorção de GPV em agarose-IDA-Ni²⁺. A melhor condição encontrada para a purificação da GPV foi a alimentação de lisado de células em presença de tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 2 mM pH 7,0, com lavagem realizada utilizando-se tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 2 mM pH 6,0 e eluição por aumento de concentração de imidazol para 200 e 500 mM pH 6,0, uma vez que se obteve uma proteína de massa molecular similar à da GPV nas frações de eluição com pouca presença de impurezas, proteína esta verificada, também, por *western blotting*. No entanto, a captura da GPV por agarose-IDA-Ni²⁺ pode ter sido prejudicada pela inacessibilidade da cauda de polihistidina para a interação com o metal imobilizado, uma vez que mesmo utilizando-se Cu²⁺ como íon imobilizado, pouca GPV foi adsorvida.

Destaca-se que devido ao fato do teste ELISA ser mais adequado na detecção de concentrações de GPV maiores que 25 ng/mL, interferências no resultado do ELISA podem ter ocorrido de modo que concentrações menores de GPV nas frações cromatográficas fossem detectadas pelo método, subestimando o resultado.

Comparando-se a coluna Histrap, contendo níquel imobilizado em um agente quelante não divulgado pelo fabricante, e a coluna contendo agarose-IDA-Ni²⁺, observou-se uma melhor seletividade quando utilizado agarose-IDA-Ni²⁺ sintetizada em nosso laboratório, apesar de ser indicada pelo fabricante para purificação de proteínas com cauda de polihistidina.

Ressalta-se que quando utilizado o gel de agarose-Con A, não se observou na eletroforese a presença da proteína com massa molecular equivalente à da GPV nas frações de eluição. Da mesma forma, o teste ELISA não detectou GPV na eluição, confirmando que a GPV não foi adsorvida em agarose-Con A, apesar dos resultados apresentados por Perez et al. (1998), terem mostrado a adsorção de glicoproteína G do vírus da raiva que infecta peixes em agarose-Con A. Assim, pode-se concluir que o melhor adsorvente para a purificação da GPV foi agarose-IDA-Ni²⁺.

Portanto, os resultados obtidos permitem concluir que a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados é uma técnica potencialmente viável para a purificação de GPV a partir de lisado de células, uma vez observada a presença da GPV nas frações de eluição com pouca presença de impurezas, assim como, a seletividade do método e sua reprodutibilidade.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Devido à importância do desenvolvimento de vacinas de baixo custo e eficazes, à grande demanda de vacina contra o vírus da raiva no Brasil e à importância do desenvolvimento de pesquisas na área de purificação de proteínas recombinantes, torna-se relevante a continuação de pesquisas envolvendo purificação de GPV. Portanto, as sugestões para trabalhos futuros são:

- a) Utilizar outros tipos lectinas como adsorvente para purificar GPV; Estudar a purificação da GPV por cromatografia de filtração em gel ou por cromatografia de interação hidrofóbica;
- c) Investigar o potencial de separação da GPV por precipitação;
- d) Testar se a alimentação de lisado contendo maior concentração de GPV proporciona maior adsorção de GPV no sistema cromatográfico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUINO, L. C. L.; SOUSA, H. R. T.; MIRANDA, E. A.; VILELA, L.; BUENO, S. M. A. Evaluation of IDA-PEVA hollow fiber membrane metal ion affinity chromatography for purification of a histidine-tagged human proinsulin. *Journal of Chromatography B*, v. 384, p. 68-76, 2006.

ANDERSSON, L.; PORATH, J. Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe^{3+}) affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, v. 154, p. 250-254, 1986.

ARNOLD, F. H. Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing. *Biotechnology*, v. 9, p. 151-156, 1991.

ATKINS, E.; ZAMORA, S.; CANDIA, B. J.; BACA, A.; ORLANDO, R. A. Development of a mammalian suspension culture for expression of active recombinant human urokinase-type plasminogen activator. *Cytotechnology*, v. 49, p. 25-37, 2005.

BATISTA, F. R. X.; GALES, A. L. L.; MENDONÇA, R. Z.; PEREIRA, C. A.; MORAES, A. M. Formulação de meios de cultura para células de *Drosophila melanogaster* S2 com potencial para a produção da glicoproteína G do vírus da raiva. *Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos*, p. 1-7, 2005.

BEITLER, R. R.; ATAAI, M. M. Immobilized metal affinity chromatography and related techniques. *AIChE Symposium Series*, v. 88, n. 290, p. 34-43, 1992.

BENTING, J.; LECAT, S.; ZACCHETTI, D.; SIMONS, K. Protein expression in *Drosophila* Schneider cells. *Analytical Biochemistry*, v. 278, p. 59-68, 2000.

BOULIS, Y.; MARCH, G. G.; GOMORD, V.; ADENIER, H.; FAYE, L.; VIJAYALAKSHMI, M. A. Analysis of sporamin forms expressed in different subcellular compartments of transgenic tobacco plants by IMAC and ESI-MS. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 41, p. 215-221, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRESOLIN, I. T. L. Purificação de anticorpos monoclonais utilizando IMAC em membranas de fibra oca de PEVA: comparação dos agentes quelantes IDA, CM-ASP e TREN. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006. 124 p. Dissertação (mestrado).

CARLSSON, J.; JANSON, J.; SPARRMAN, M. Affinity chromatography in: Protein purification: principles, high resolution methods, and applications. Ed. Janson, J.; Rydén, L., VCH Publishers, Inc., p. 275-329, 1989.

CHAGA, G.; BOCHKARIOV, D. E.; JOKHADZE, G. G.; HOPP, J.; NELSON, P. Natural poly-histidine affinity tag for purification of recombinant proteins on cobalt(II)-carboxymethylaspartate crosslinked agarose. *Journal of Chromatography A*, v. 864, p. 247-256, 1999.

CHAGA, G. S. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49, p. 313-334, 2001.

CLEMMITT, R. H.; CHASE, H. A. Facilitated downstream processing of a histidine-tagged protein from unclarified *E. coli* homogenates using immobilized metal affinity expanded-bed adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 67, n. 2, p. 206-216, 2000.

CLEVERLEY, D. Z.; LENARD J. The transmembrane domain in viral fusion: essencial role for a conserved glycine residuo in vesicular stomatitis virus G protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, p. 3425-3430, 1998.

CLIQUET, F.; MULLER, T.; MUTINELLI, F.; GERONUTTI, S.; BROCHIER, B.; SELHORST, T.; SCHEREFFER, J. L.; KRAFFT, N.; BUROW, J.; SCHAMEITAT, A.; SCHLUTER, H.; AUBERT, M. Standardisation and establishment of a rabies

ELISA test in european laboratories for assessing the efficacy of oral fox vaccination campaigns. *Vaccine*, v. 21, p. 2986-2993, 2003.

COLL, J. M. The glycoprotein G of rhabdoviruses. *Archives of Virology*, v. 140, p. 827-851, 1995.

CULP, J. S.; JOHANSEN, H.; HELLMIG, B.; BECK, J.; MATTHEWS, T. J.; DELERS, A.; ROSENBERG, M. Regulated expression allows high level production and secretion of HIV-1 gp120 envelope glycoprotein in *Drosophila* Schneider cells. *Bio/Technology*, v. 9, p. 173-177, 1991.

DA POIAN, A. T.; CARNEIRO, F. A.; STAUFFER, F. Viral membrane fusion: is glycoprotein G of rhabdoviruses a representative of a new class of viral fusion proteins? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 38, p. 813-823, 2005.

DELM, L.; SCHIRMBECK, R.; REIMANN, J.; WOLF, H.; WAGNER, R. Purification and characterization of hepatitis B virus surface antigen particles produced in *Drosophila* Schneider-2 cells. *Journal of Virological Methods*, v. 79, p. 205-217, 1999.

DESMÉZIÈRES, E.; MAILLARD, A. P.; GAUDIN, Y.; TORDO, N.; PERRIN, P. Differential stability and fusion activity of Lyssavirus glycoprotein trimers. *Virus Research*, v. 91, p. 181-187, 2003.

DÍAZ, A. M.; DELLEPIANE, N.; PALOMO, L. F. Vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante: composición antigénica y capacidad inmunógena. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, v. 107, n. 3, p. 185-194, 1989.

DIOGO, M. M.; RIBEIRO, S. C.; QUEIROZ, J. A.; MONTEIRO, G. A.; TORDO, N.; PERRIN, P.; PRAZERES, D. M. F. Production, purification and analysis of an experimental DNA vaccine against rabies. *The Journal of Gene Medicine*, v. 3, p. 577-584, 2001.

DREESEN, D. W. A global review of rabies vaccines for human use. *Vaccine*, v. 15, p. S2-S6., 1997.

DRINGS, A.; JALLET, C.; CHAMBERT, B.; TORDO, N.; PERRIN, P. Is there an advantage to including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine? *Vaccine*, v. 17, p. 1549-1557, 1999.

EL-KAK, A.; VIJAYALAKSHMI, M. A. Study of the separation of mouse monoclonal antibodies by pseudobioaffinity chromatography using matrix-linked histidine and histamine. *Journal of Chromatography*, v. 570, p. 29-41, 1991.

ERSSON, B.; RYDÉN, L.; JANSON, J. Introduction to Protein Purification in: Protein purification: principles, high resolution methods, and applications. Ed. Janson, J.; Rydén, L., VCH Publishers, Inc., p. 3-34, 1989.

FRAZATTI-GALLINA, N. M.; MOURÃO-FUCHES, R. M.; PAOLI, R. L.; SILVA, M. L. N.; MIYAKI, C.; VALENTINI, E. J. G.; RAW, I.; HIGASHI, H. G. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine*, v. 23, p. 511-517, 2004.

GABERC-POREKAR, V.; MENART, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49, p. 335-360, 2001.

GALESI, A. L. L.; PEREIRA, C. A.; MORAES, A. M. Utilização de hidrolisados protéicos para substituição do soro fetal bovino no cultivo das células de *Drosophila melanogaster* S2AcGPV2. *XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química – CD-Rom*, p. 4945-4951, 2006.

GAUDIN, Y.; RUIGROK, R. W. H.; TUFFEREAU, C.; KNOSSOW, M.; FLAMAND, A. rabies virus glycoprotein Is a trimer. *Virology*, v. 187, p. 627-632, 1992.

GAUDIN, Y. Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. *Journal of Virology*, v. 71, n. 5, p. 3742-3750, 1997.

GOOD, N. E.; WINGET, G. D.; WINTER, W.; CONNOLLY, T. N.; IZAWA, S.; SINGH, R. M. M. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*, v. 5, n. 2, p. 467, 1966.

GUPTA, P. K.; SHARMA, S.; WALUNJ, S. S.; CHATURVEDI, V. K.; RAUT, A. A.; PATIAL, S.; RAI, A.; PANDEY, K. D.; SAINI, M. Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus. *Veterinary Microbiology*, v. 108, p. 207-214, 2005.

HOCHULI, E. Large-scale chromatography of recombinant proteins. *Journal of Chromatography*, v. 444, p. 293-302, 1988.

KRÁČALÍKOVÁ, K.; TISHCHENKO, G.; BLEHA, M. Effect of the matrix structure and concentration of polymer-immobilized Ni²⁺-iminodiacetic acid complexes on retention of IgG₁. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 67, p. 7-25, 2006.

KUMAR, A. A. P.; MANI, K.R.; PALANIAPPAN, C.; BHANU, L. N. R.; SWAMINATHAN, K. Purification, potency and immunogenicity analysis of vero cell culture-derived rabies vaccine: a comparative study of single-step column chromatography and zonal centrifuge purification. *Microbes and Infection*, v. 7, p. 1110-1116, 2005.

LI, B.; TSING, S.; KOSAKA, A. H.; NGUYEN, B.; OSEN, E. G.; BACH, C.; CHAN, H.; BARNETT, J. Expression of human dopamine β-hydroxylase in *Drosophila* Schneider 2 cells. *Biochemical Journal*, v. 313, p. 57-64, 1996.

LIM, H. J.; KIM, Y. K.; HWANG, D. S.; CHA, H. J. Expression of functional human transferrin in stably transfected *Drosophila* S2 cells. *Biotechnology Progress*, v. 20, p. 1192-1197, 2004.

MAILLARD, A. P.; GAUDIN, Y. Rabies virus glycoprotein can fold in two alternative, antigenically distinct conformations depending on membrane-anchor type. *Journal of General Virology*, v. 83, p. 1465-1476, 2002.

MAILLARD, A.; DOMANSKI, M.; BRUNET, P.; CHAFFOTTE, A.; GUITTET, E.; GAUDIN, Y. Spectroscopic characterization of two peptides derived from the stem of rabies virus glycoprotein. *Virus Research*, v. 93, p. 151-158, 2003.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for protein in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*, v. 117, p. 307-310, 1981.

MRABET, N. T. One-step purification of *actinoplanes missouriensis* D-xylose isomerase by high-performance immobilized copper-affinity chromatography: functional analysis of surface histidine residues by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, v. 31, p. 2690-2702, 1992.

NAGARAJAN, T.; REDDY, G. S.; SUBRAMANIAN, B. M.; RAJALAKSHMI, S.; THIAGARAJAN, D.; TORDO, N.; JALLET, C.; SRINIVASAN, V. A. A simple immuno-capture ELISA to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture. *Biologicals*, v. 34, n. 1, p. 21-27, 2006.

PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases hsbab .Part I. Underlying theories. *Journal of Chemical Education*. v. 45, p. 581-587, 1968 (a).

PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases hsbab .Part II. Underlying theories. *Journal of Chemical Education*. v. 45, p. 643-659, 1968 (b).

PEREZ, L.; ESTEPA, A.; COLL, J. M. Purification of the glycoprotein G from viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus, by lectin affinity chromatography. *Journal of Virological Methods*, v. 76, p. 1-8, 1998.

PORATH, J.; CARLSSON, J.; OLSSON, I.; BELFRAGE, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, v. 258, p. 598-599, 1975.

PORATH, J.; OLIN, B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry*, v. 22, p. 1621-1630, 1983.

PORATH, J. Immobilized metal ion affinity based chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 7, n. 7, 1988.

RATH, A.; CHOUDHURY, S.; BATRA, D.; KAPRE, S. V.; RUPPRECHT, C. E.; GUPTA, S. K. DNA vaccine for rabies: relevance of the trans-membrane domain of the glycoprotein in generating an antibody response. *Virus Research*, v. 113, p. 143-152, 2005.

RIBEIRO, M. B. Purificação de IgG a partir do plasma humano por cromatografia em membranas com íons Cu(II) e Ni(II) imobilizados: efeito dos agentes quelantes IDA, TREN e CM-ASP. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006. 185 p. Dissertação (doutorado).

RUPPRECHT, C. E., HANLON, C. A., HEMACHUDHA, T., Rabies re-examined. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 2, p. 327-343, 2002.

SATO, G.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; MIURA, Y.; MIKAMI, T.; ITO, M.; KURANE, I.; SAMARA, S.; CARVALHO, A. A. B.; NOCITI, D. P.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 66, n. 7, p. 747-753, 2004.

SERPA, G. Purificação de anticorpos monoclonais anti-TNP do isotipo IgG₁ utilizando cromatografia em membranas de afinidade com íons metálicos imobilizados. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002. 105 p. Dissertação (mestrado).

SERPA, G.; AUGUSTO, E. F. P.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; RIBEIRO, M. B.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of an immunoglobulin G₁ monoclonal antibody. *Journal of Chromatography B*, v. 816, p. 259-268, 2005.

SHARMA, S.; AGARWAL, G. P. Comparative studies on the metal sorption characteristics of chelating gels for immobilized metal ion affinity chromatography. *Separation Science and Technology*, v. 37, n. 15, p. 3491-3511, 2002.

SHIH, Y.; PRAUSNITZ, J. M.; BLANCH, H. W. Some characteristics of protein precipitation by salts. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 40, p. 1155-1164, 1992.

SIDENIUS, U.; FARVER, O.; JONS, O.; GAMMELGAARD, B. Comparison of different transition metal ions for immobilized metal affinity chromatography of selenoprotein P from human plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 735, p. 85-91, 1999.

SMITH, J. S. New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis, and prevention of the disease in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 9, n. 2, p. 166-176, 1996.

SOKOL, F.; SCHLUMBERGER, H. D.; WIKTOR, T. J.; KOPROWSKI, H. Biochemical and biophysical studies on the nucleocapsid and on the RNA of rabies virus. *Virology*, v. 38, p. 651-665, 1969.

SULKOWSKI, E. Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 1-7, 1985.

SULKOWSKI, E. The saga of IMAC and MIT. *BioEssays*, v. 10, n. 5, p. 170-175, 1989.

SULKOWSKI, E. Immobilized metal-ion affinity chromatography: imidazole proton pump and chromatographic sequelae. II. Chromatographic sequelae. *Journal of Molecular Recognition*, v. 9, p. 494-498, 1996.

THOULOZE, M. I.; LAFAGE, M.; SCHACHNER, M.; HARTMANN, U.; CREMER, H.; LAFON, M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *Journal of Virology*, v. 72, n. 9, p. 7181-7190, 1998.

TIKHONOV, R.V., PECHENOV, S.E., BELACHEU, I.A., YAKIMOV, S.A., KLYUSHNICHENKO, V.E., BOLDIREVA, E.F., KOROBKO, V.G., TUNES, H., THIEMANN, J.E., VILELA, L., WULFSON, A.N. Recombinant human insulin. VIII. Isolation of fusion protein-S-sulfonate, biotechnological precursor of human insulin,

from the biomass of transformed *Escherichia coli* cells. *Protein Expression and Purification*, v.21, p.176-182, 2001.

TODOROVA-BALVAY, D.; PITIOT, O.; BOURHIM, M.; SRIKRISHNAN, T.; VIJAYALAKSHMI, M. Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments. *Journal of Chromatography B*, v. 808, p. 57-62, 2004.

TOTA, M. R.; XU, L.; SIROTINAS, A.; STRADER, C. D.; GRAZIANO, M. P. Interaction of [fluorescein-Trp²⁵] glucagon with the human glucagon receptor expressed in *Drosophila* Schneider 2 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 44, p. 26466 – 26472, 1995.

TUFFEREAU, C.; BÉNÉJEAN, J.; BLONDEL, D.; KIEFFER, B.; FLAMAND, A. Low-affinity nerve –growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *The EMBO Journal*, v. 17, n. 24, p. 7250-7259, 1998.

UEDA, E. K. M.; GOUT, P. W.; MORGANTI, L. Current and prospective applications of metal ion-protein binding. *Journal of Chromatography A*, v. 988, p. 1-23, 2003.

VANÇAN, S.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. IMAC of human IgG: studies with IDA-immobilized copper, nickel, zinc, and cobalt ions and different buffer systems. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 573-579, 2002.

VIJAYALAKSHMI, M. A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. *Trends in Biotechnology*, v. 7, n. 3, p. 71-76, 1989.

WINZERLING, J. J.; BERNA, P.; PORATH, J. How to use immobilized metal ion affinity chromatography, *Methods*, v. 4, p. 4-13, 1992.

WOJCZYK, B. S.; CZERWINSKI, M.; STWORA-WOJCZYK, M. M.; SIEGEL, D. L.; ABRAMS, W. R.; WUNNER, W. H.; SPITALNIK, S. L. Purification of a secreted form of recombinant rabies virus glycoprotein: comparison of two affinity tags. *Protein Expression and Purification*, v. 7, p. 183-193, 1996.

WONG, J. W.; ALBRIGHT, R.L.; WANG, N.L. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) - chemistry and bioseparation applications. *Separation and Purification Methods*, v. 20, n. 1, p. 49-106, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO expert consultation on rabies: first report. *WHO Technical Report Series*, v. 931, p. 1-121, 2004.

WUNNER, W. H.; REAGAN, K. J.; KOPROWSKI, H. Characterization of saturable bindings sites for rabies virus. *Journal of Virology*, v. 50, n.3, p. 691-697, 1984.

YOKOMIZO, A. Y; JORGE, S. A. C.; ASTRAY R. M.; FERNANDES I.; RIBEIRO O. G.; HORTON D. S. P. Q.; TONSO, A.; TORDO, N.; PEREIRA, C. A. Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. *Biotechnology Journal*, v. 2, p. 102-109, 2007.

ZATLOUKALOVÁ, E.; KUČEROVÁ, Z. Separation of cobalt binding proteins by immobilized metal affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 808, p. 99-103, 2004.

APÊNDICE A

Neste apêndice estão apresentados os cromatogramas e eletroforeses das duplicatas realizadas, assim como os balanços de massa para proteína total das cromatografias. Além disso, estão apresentadas as curvas de calibração de ELISA quando anticorpos monoclonais ou policlonais foram utilizados e a formulação do meio de cultivo TC100 insect medium (Cultilab, Brasil).

a) MMA

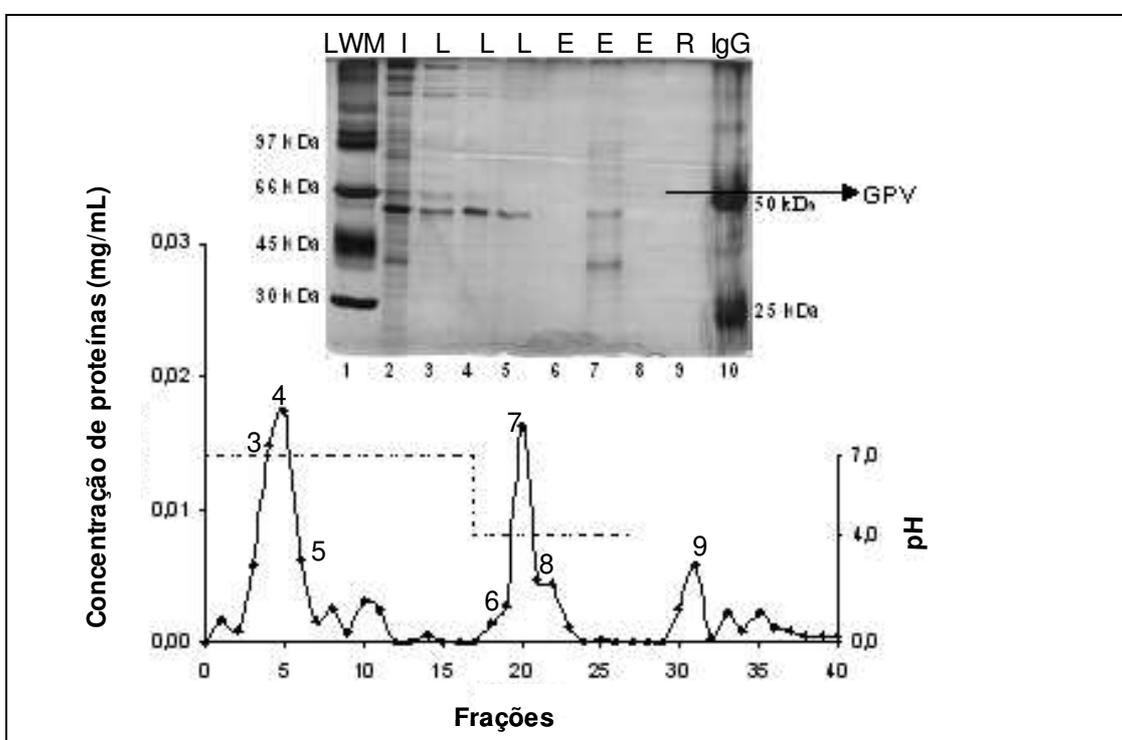


Figura A1. Cromatografia de sobrenadante de cultura celular (Sf900II – lote A) no sistema tamponante MMA em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Adsorção com MMA 50 mM, NaCl 1M pH 7,0; dessorção com MMA 50 mM, NaCl 1 M pH 4,0 e regeneração EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-5. lavagem (L), 6-8. eluição (E), 9. regeneração (R), 10. marcador de IgG humana (Aventis).

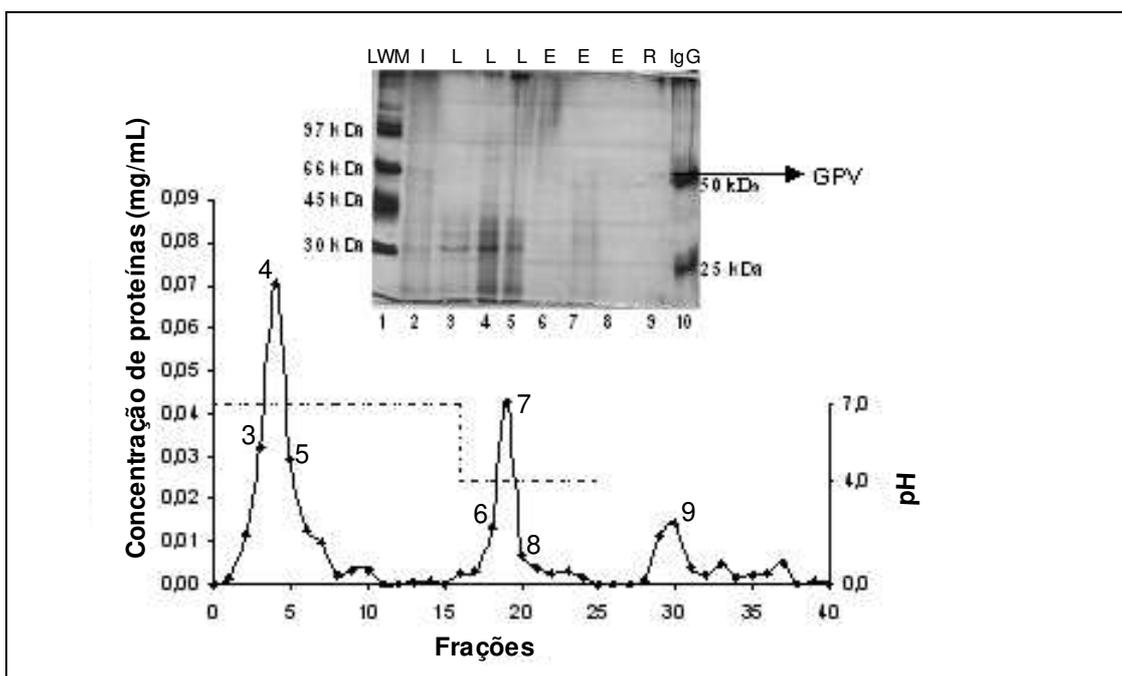


Figura A2. Cromatografia de lisado de células (Sf900II – lote A) no sistema tamponante MMA em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Adsorção com MMA 50 mM, NaCl 1M pH 7,0; dessorção com MMA 50 mM, NaCl 1 M pH 4,0 e regeneração EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-5. lavagem (L), 6-8. eluição (E), 9. regeneração (R), 10. marcador de IgG humana (Aventis).

Tabela A1. Balanços de massa para proteína total das cromatografias em agarose-IDA-Ni²⁺ utilizando o sistema tamponante MMA e alimentação de sobrenadante e lisado (Sf900II).

Frações	Tipo de Alimentação			
	Sobrenadante (lote A)		Lisado (lote A)	
	(mg) ¹	(%) ²	(mg) ¹	(%) ²
Alimentação	0,26	100,00	1,03	100,00
Lavagem	0,14	55,95	0,44	42,91
Eluição	0,08	30,04	0,20	19,16
Regeneração	0,04	16,43	0,12	11,91
Recuperação	0,26	102,42	0,76	73,98

¹ Proteína Total ² Porcentagem

b) Fosfato-imidazol

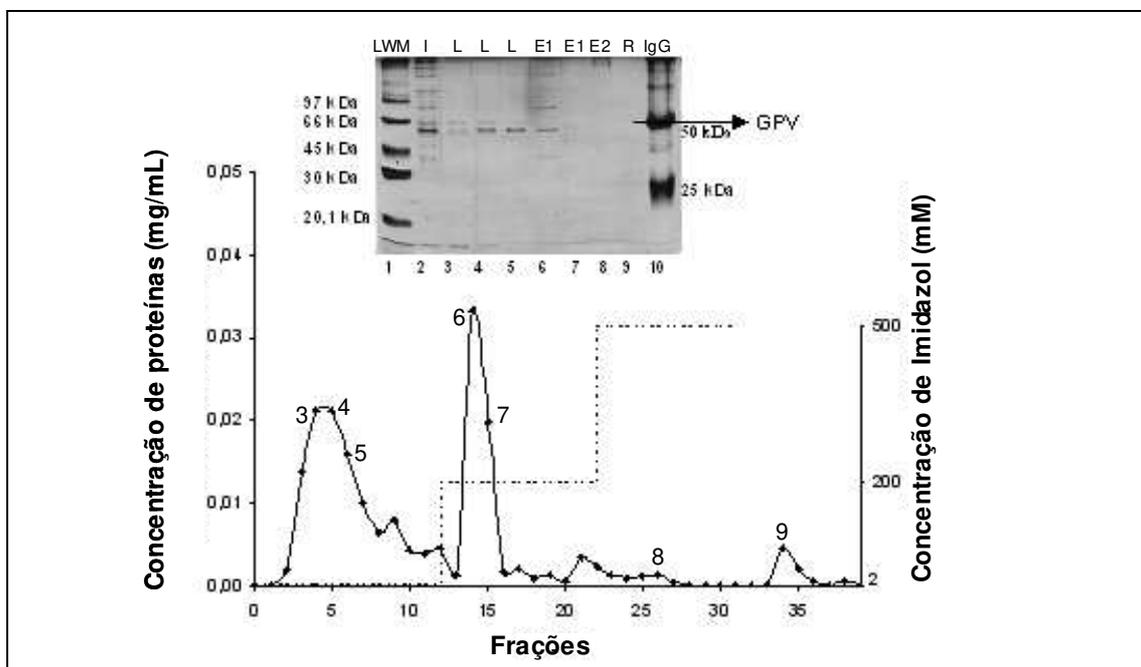


Figura A3. Cromatografia de sobrenadante de cultura celular (TC100 – lote C) no sistema tamponante em fosfato-imidazol em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Equilíbrio com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 7,0; lavagem com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 6,0; dessorção com tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 200 e 500 mM pH 6,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-5. lavagem (L), 6-7. eluição 1 (E1), 8. eluição 2 (E2), 9. regeneração (R), 10. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições das amostras para a eletroforese: 2 (2X).

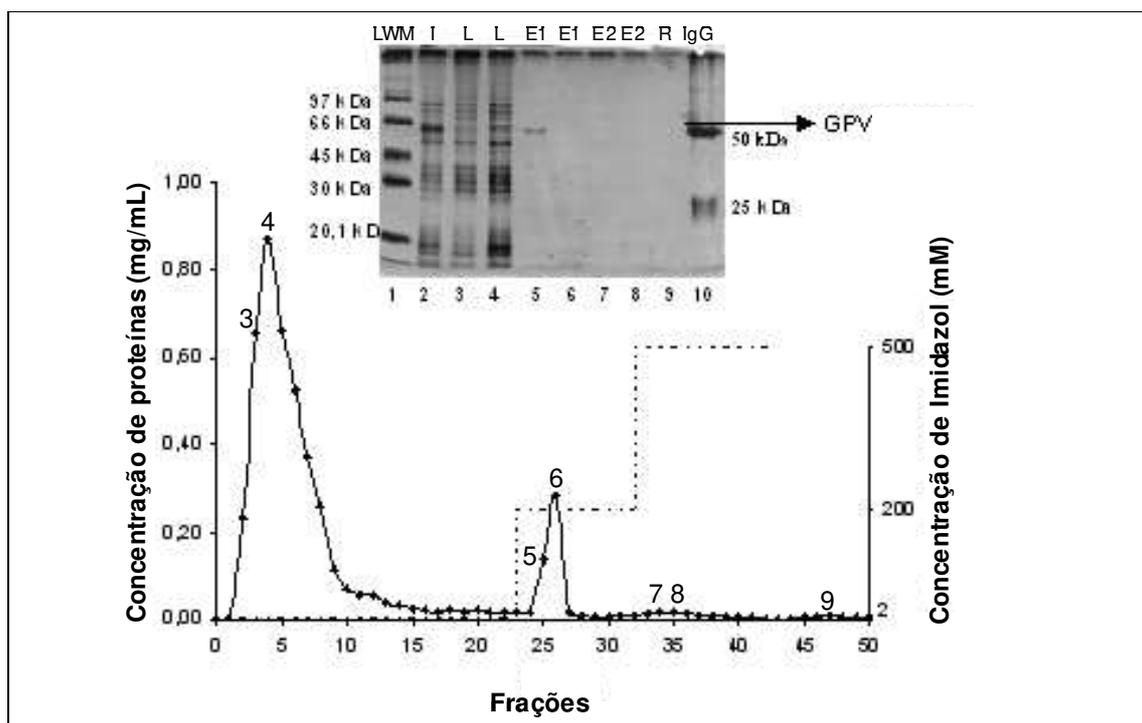


Figura A4. Cromatografia de lisado de células (TC100 – lote C) no sistema tamponante em fosfato-imidazol em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Equilíbrio com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 7,0; lavagem com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 6,0; dessorção com tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 200 e 500 mM pH 6,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7-8. eluição 2 (E2), 9. regeneração (R), 10. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições na eletroforese: 2(30X), 3/4 (10X), 5/6 (4X).

Tabela A2. Balanço de massa para proteína total da cromatografia em agarose-IDA-Ni²⁺ utilizando o sistema no sistema tamponante fosfato-imidazol e alimentação de sobrenadante (TC100) e lisado de células (TC100).

Frações	Alimentação			
	Sobrenadante (lote C)		Lisado (lote C)	
	(mg) ¹	(%) ²	(mg) ¹	(%) ²
Injeção	0,40	100,00	12,15	100,00
Lavagem	0,27	66,49	10,23	84,21
Eluição 1	0,17	42,97	1,24	10,19
Eluição 2	0,02	4,47	0,24	1,95
Regeneração	0,02	7,20	0,06	0,49
Recuperação	0,48	118,71	11,76	96,84

¹ Proteína Total

² Porcentagem

c) Fosfato-acetato

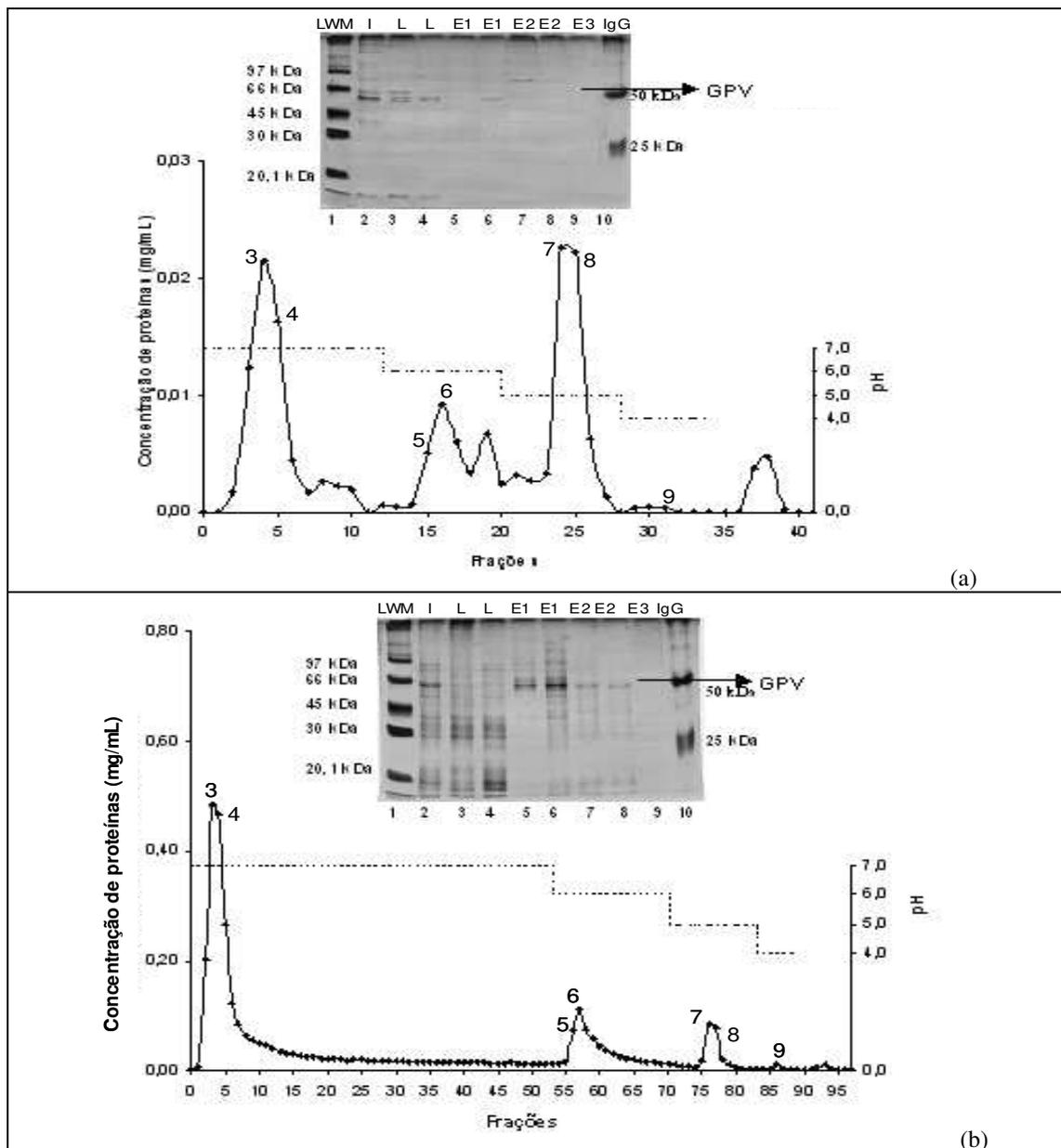


Figura A5. Cromatografia de sobrenadante de cultura celular (TC100) (a) e do lisado de células (TC100) (b) no sistema tamponante fosfato-acetato em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Adsorção com fosfato 25 mM, NaCl 1 M pH 7,0; dessorção com tampão fosfato 25 mM, NaCl 1 M pH 6,0, acetato 25 mM, NaCl 1 M pH 5,0/4,0 e regeneração EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7-8. eluição 2 (E2), 9. eluição 3 (E3), 10. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições na eletroforese (a): 2 (2X). Diluições das amostras para a eletroforese (b): 2 (30X), 3/4 (10X), 5/6 (2X), 7/8 (2X).

Tabela A3. Balanço de massa para proteína total da cromatografia de sobrenadante de cultura celular (TC100) e lisado de células (TC100) em agarose-IDA-Ni²⁺ utilizando o sistema no sistema tamponante fosfato-acetato.

Frações	Alimentação			
	Sobrenadante (lote C)		Lisado (lote C)	
	(mg) ¹	(%) ²	(mg) ¹	(%) ²
Injeção	0,40	100,00	9,19	100,00
Lavagem	0,16	40,58	6,39	69,57
Eluição 1	0,08	20,21	1,47	16,02
Eluição 2	0,16	40,22	0,62	6,73
Eluição 3	0,00	0,66	0,05	0,55
Regeneração	0,02	5,47	0,05	0,49
Recuperação	0,43	107,14	8,58	93,35

¹ Proteína Total

² Porcentagem

d) Tris-HCl

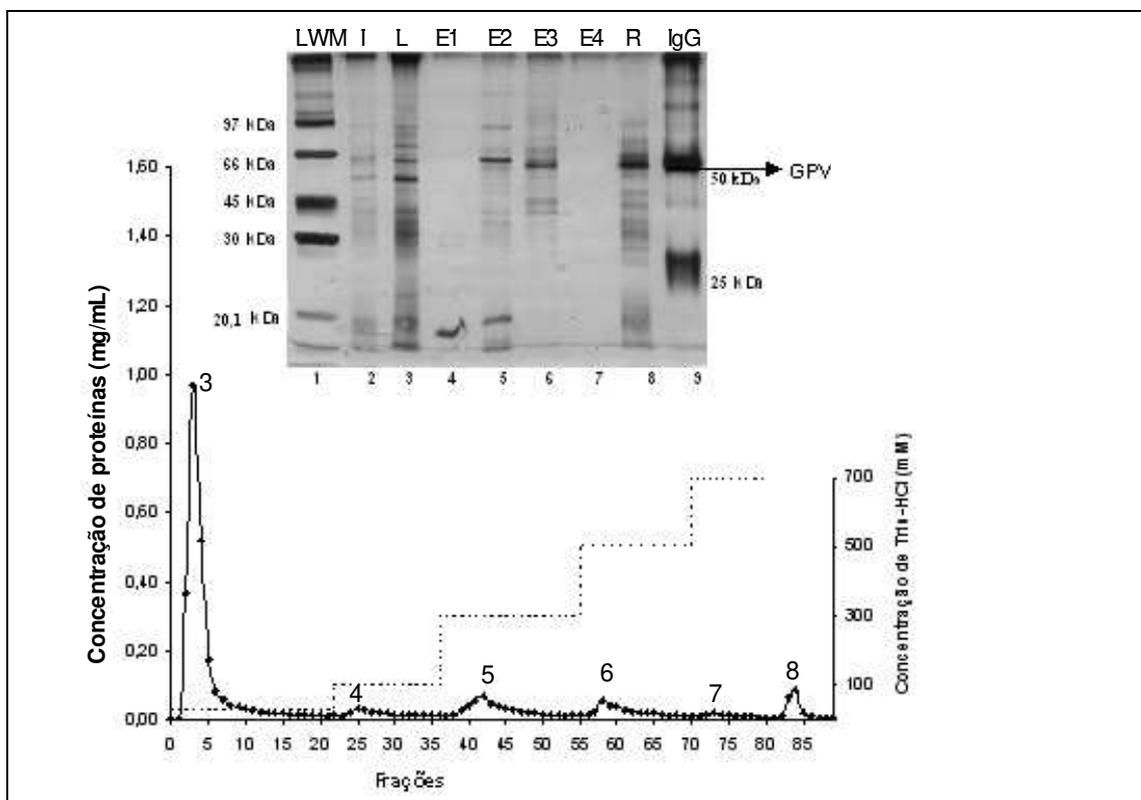


Figura A6. Cromatografia de lisado de células (TC100) no sistema tamponante Tris-HCl em agarose-IDA-Ni²⁺. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Adsorção com Tris-HCl 25 mM pH 7,0; dessorção com tampão Tris-HCl 100/300/500/700 mM pH 7,0 e regeneração com EDTA 50 mM pH 7,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3. lavagem (L), 4. eluição 1 (E1), 5. eluição 2 (E2), 6. eluição 3 (E3), 7. eluição 4 (E4), 8. regeneração (R), 9. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições das amostras para a eletroforese: 2 (50X), 3 (20X), 8 (2X).

Tabela A4. Balanço de massa para proteína total da cromatografia de lisado de células (TC100) em agarose-IDA-Ni²⁺ utilizando o sistema no sistema Tris-HCl.

Frações	Alimentação	
	Lisado (lote C)	
	(mg) ¹	(%) ²
Injeção	10,24	100,00
Lavagem	6,17	60,28
Eluição 1	0,62	6,10
Eluição 2	1,19	11,59
Eluição 3	0,83	8,08
Eluição 4	0,28	2,74
Regeneração	0,52	5,08
Recuperação	9,61	93,86

¹ Proteína Total

² Porcentagem

Histrap

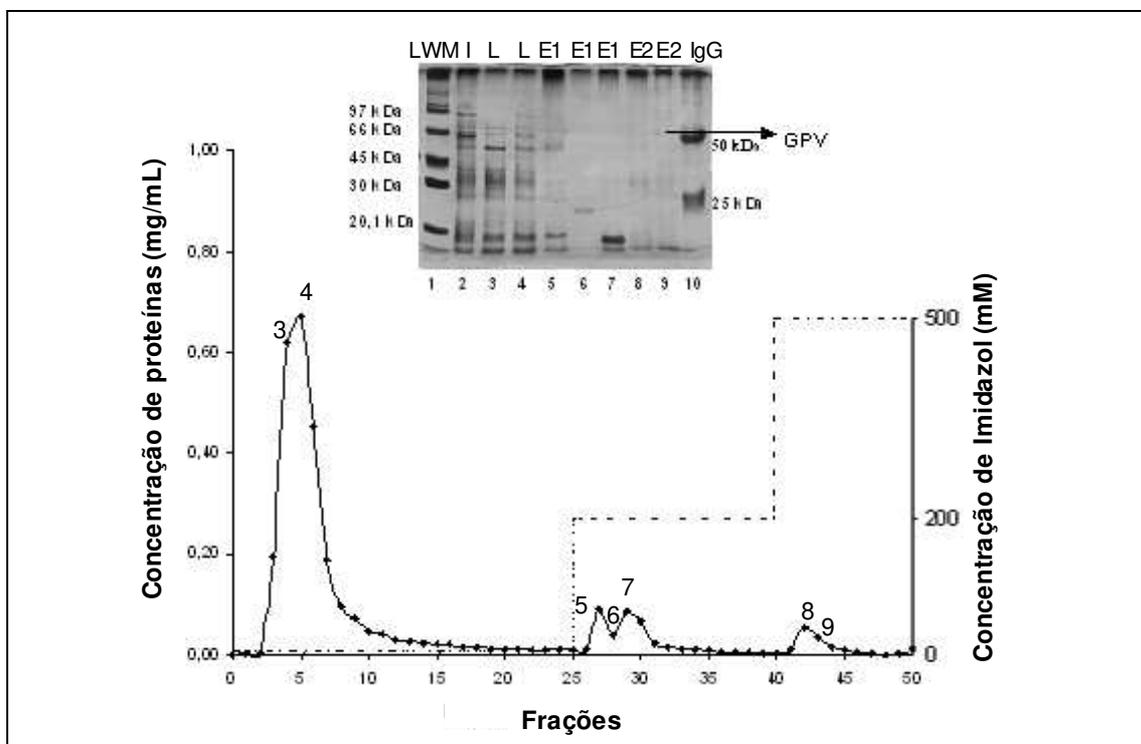


Figura A7. Cromatografia em coluna Histrap de lisado de cultura celular (TC 100) no sistema tamponante fosfato-imidazol. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Equilíbrio com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 7,0; lavagem com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 2 mM pH 6,0; dessorção com tampão fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 200 e 500 mM pH 6,0. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7-8. eluição 2 (E2), 9. regeneração (R), 10. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições das amostras para a eletroforese: 2(20X), 3/4 (10X).

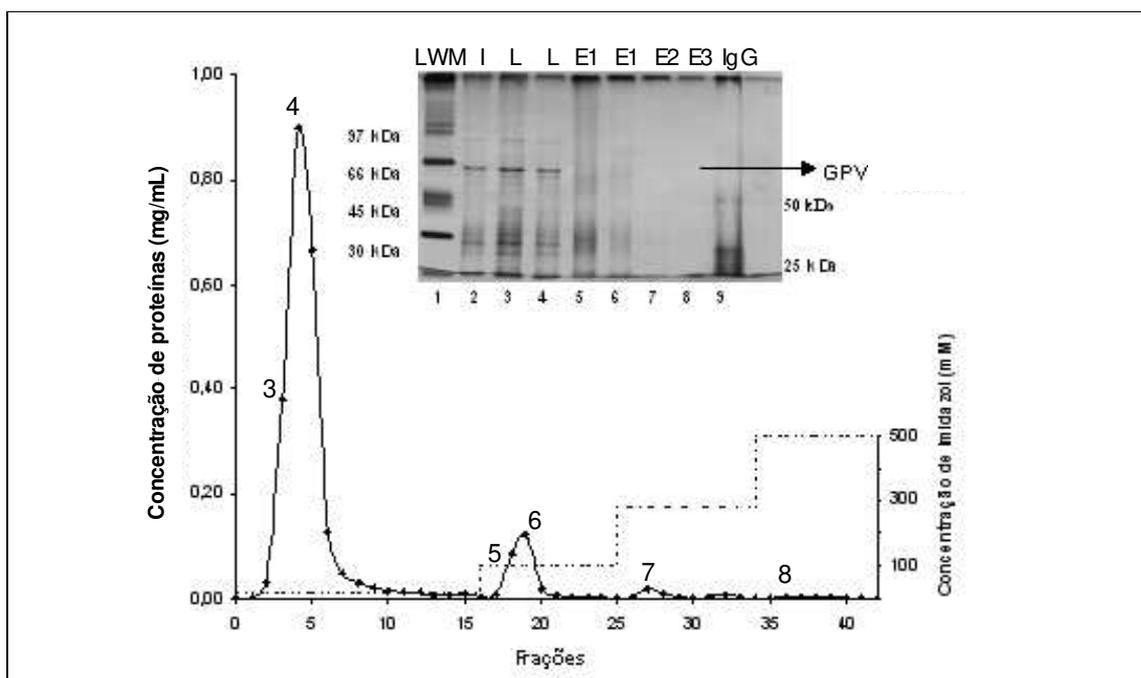


Figura A8. Cromatografia em coluna Histrap de lisado de cultura celular (TC 100) no sistema tamponante fosfato-imidazol. Adsorção com fosfato 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM pH 7,4 e dessorção por aumento de concentração de imidazol 100/300/500 mM. Alimentação 5,0 mL. Vazão 0,5 mL/min. Eletroforese em gel de acrilamida 10% (corrida em 180V): 1. marcador de baixa massa molecular (LWM), 2. alimentação (I), 3-4. lavagem (L), 5-6. eluição 1 (E1), 7. eluição 2 (E2), 8. eluição 3 (E3), 9. marcador de IgG humana (Aventis). Diluições das amostras para a eletroforese: 2(20X), 3/4 (10X), 6 (2X).

Tabela A5. Balanço de massa para proteína total da cromatografia em Histrap utilizando o sistema no sistema tamponante fosfato-imidazol. Alimentação de lisado de células (TC100).

Frações	Alimentação			
	Lisado (lote C) ¹		Lisado (lote C) ²	
	(mg) ³	(%) ⁴	(mg) ³	(%) ⁴
Injeção	10,06	100,00	7,25	100,00
Lavagem	6,52	64,87	5,65	77,97
Eluição 1	0,99	9,84	0,63	8,74
Eluição 2	0,36	3,59	0,12	1,62
Eluição 3	-	-	0,02	0,33
Regeneração	-	-	-	-
Recuperação	7,87	78,30	6,43	88,65

¹ Sistema tamponante fosfato-imidazol pH 6,0, dessorção por aumento da concentração de imidazol para 200 mM (Eluição 1) e 500 mM (Eluição 2)

² Sistema tamponante fosfato-imidazol pH 7,4, dessorção por aumento de concentração de imidazol 100 mM (Eluição 1), 300 mM (Eluição 2) e 500 mM (Eluição 3)

³ Proteína Total

⁴ Porcentagem

Curva de calibração de ELISA – anticorpo monoclonal

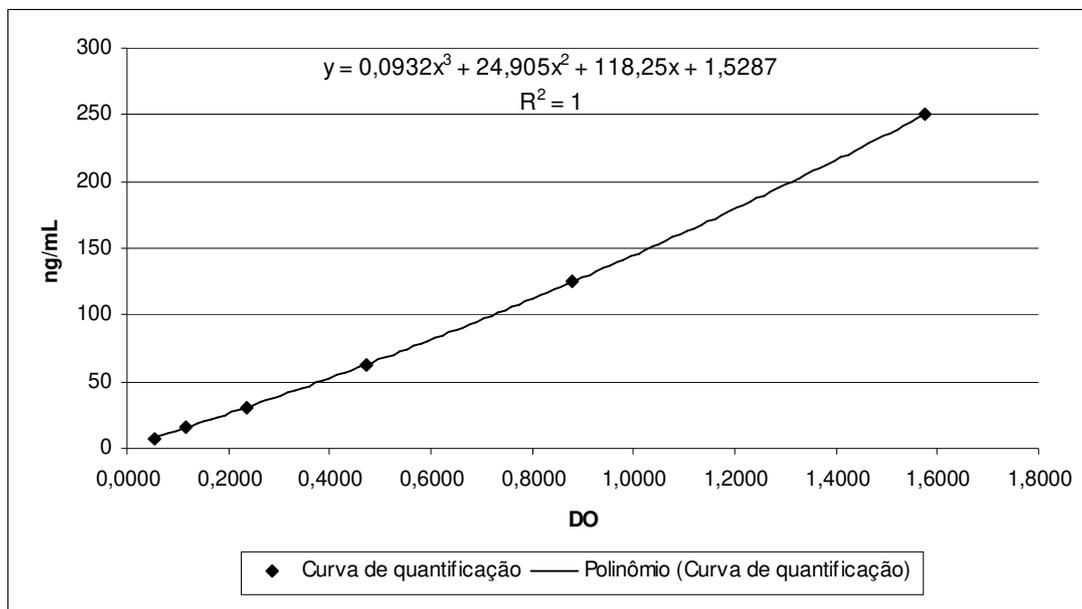


Figura A8. Curva de calibração do ELISA quando utilizados anticorpos monoclonais.

Curva de calibração de ELISA – anticorpo policlonal

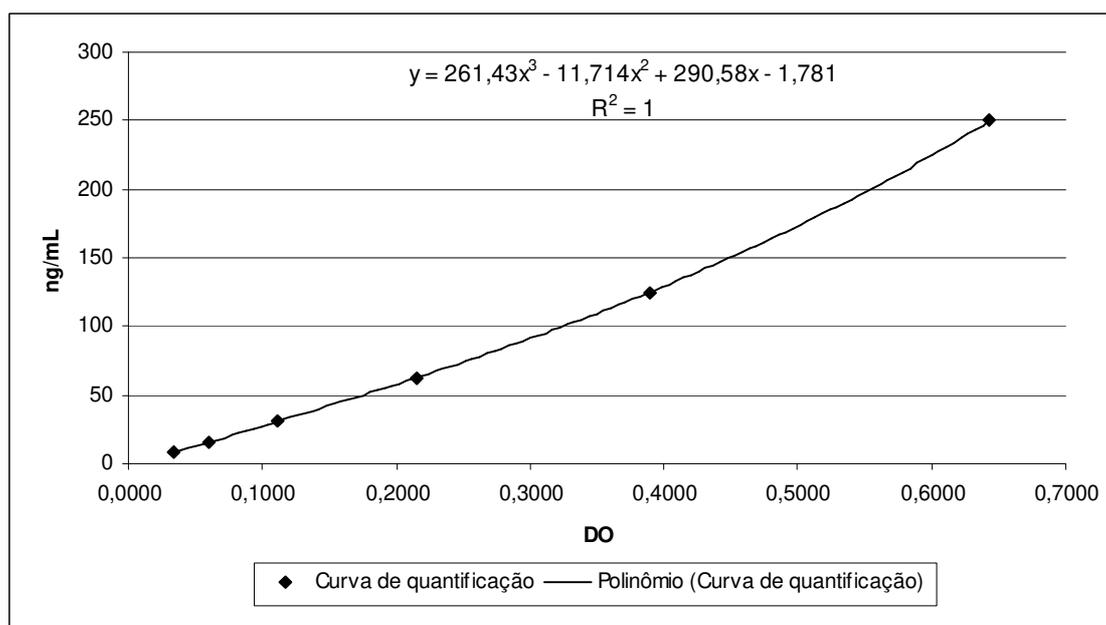


Figura A9. Curva de calibração do ELISA quando utilizados anticorpos policlonais.

Formulação do meio de cultivo TC100 insect medium (Cultilab, Brasil).

TC-100 Insect Medium	
Component	T3160 [Liquid] g/L
Inorganic salts	
CaCl ₂	0.9966
MgCl ₂ (anhyd)	1.068189
MgSO ₄ (anhyd)	1.357858
KCl	2.87
NaHCO ₃	0.35
Na ₂ HPO ₄ (anhyd)	0.876923
Amino acids	
L-Alanine	0.225
L-Arginine · HCl	0.7
L-Asparagine	0.35
L-Aspartic acid	0.35
L-Cystine · 2HCl	0.025
L-Glutamic acid	0.6
L-Glutamine	0.6
Glycine	0.65
L-Histidine	2.5
L-Isoleucine	0.05
L-Leucine	0.075
L-Lysine · HCl	0.625
L-Methionine	0.05
L-Phenylalanine	0.15
L-Proline	0.35
L-Serine	0.55
L-Threonine	0.175
L-Tryptophan	0.1
L-Tyrosine · 2Na	0.07202
L-Valine	0.1
Vitamins	
p-Aminobenzoic acid	0.00002
D-Biotin	0.00001
Choline chloride	0.0002
Folic acid	0.00002
Niacin	0.00002
D-Pantothenic acid · ½Ca	0.00002
Pyridoxine · HCl	0.00002
Riboflavin	0.00002
Thiamine	0.00002
Sugars	
D(+)-Glucose	1
Other	
Tryptose broth	2.6