

PURIFICAÇÃO DE ALBUMINA HUMANA POR
CROMATOGRÁFIA DE TROCA IÔNICA PARA
ESTUDOS IMUNOQUÍMICOS.

R.T. PINHO

ROSA TEIXEIRA DE PINHO

PURIFICAÇÃO DE ALBUMINA HUMANA POR CROMATOGRAFIA
DE TROCA IÔNICA PARA ESTUDOS IMUNOQUÍMICOS.

Tese de Mestrado apresentada ao
Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas.

Orientador: Prof.Dr. H.A.Rangel

Departamento de Microbiologia e Imunologia da
Universidade Estadual de Campinas.

Campinas - São Paulo

1977

Aos meus pais e irmãos.

Aos meus amigos que com sua presença,
ajuda, paciência e atenção em muito
colaboraram para a realização deste
trabalho.

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Humberto de Araujo Rangel, pela orientação, amizade e confiança.
- Aos Professores Avelino Rodrigues de Oliveira (Deptº de Bioquímica); Quivo S. Tahin (Dptº de Bioquímica); Alba Sanches Patelli (Dptº de Histologia), Marlene Braide Serafim (Dptº de Microbiologia e Imunologia); Irineu J. Barsanti de Camargo (Dptº de Microbiologia e Imunologia) e Anibal Eugênio Vercesi (Dptº de Bioquímica) pelas sugestões e discussão crítica dos resultados.
- Ao Professor Hermann G. Schtzmayr (Fundação Instituto Oswaldo Cruz) pelo apoio, amizade e estímulo constantes.
- Aos colegas do Curso de Pós-Graduação pela união, companheirismo e amizade acima de tudo.
- Ao colega e amigo Celso Paulino da Costa e ao Sr. Edmir Vaccarelli pelo fornecimento de plasma humano.
- Aos professores e técnicos do Departamento de Microbiologia e Imunologia pela contribuição para a realização deste trabalho.
- À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia pelos ensinamentos recebidos.

Agradecemos aos recursos fornecidos ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia da UNICAMP, pelas seguintes Instituições:

- Universidade Estadual de Campinas
- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior
- Organização Mundial de Saúde (Divisão de Imunologia)
- Biblioteca Regional de Medicina

Durante o desenvolvimento deste trabalho, a autora foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo que externa sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

Introdução.....	1
Material e Métodos.....	7
Resultados.....	12
1. Obtenção da fração Alb. 75%.....	12
2. Cromatografias.....	13
2.1. Cromatografias em DEAE-celulose...	13
2.2. Cromatografias em CM-celulose.....	18
3. Digestão da Soro Albumina Humana pela Catepsina D.....	26
Discussão.....	30
Resumo e Conclusões.....	35
Referências Bibliográficas.....	36

ABREVIATURAS

EDTA - Etilenodiamino-tetracetato

CM-celulose - Carboxi-metil celulose

DEAE-celulose - dietil-amino-etil-celulose

I(H) - fragmento inibidor obtido pela digestão da SAH
frente à Catepsina D de coelho

SAB - Soro albumina bovina

SAE - Soro albumina equina

SAH - Soro albumina humana

Fração Albumina (alb.) 75% - Fração obtida por precipi-
tação de soro humano total com sulfato de amô-
nio a 75% de saturação.

INTRODUÇÃO

A albumina humana é uma holoproteína de P.M. 66.248,3 (BEHRENS, SPIEKERMAN and BROWN, 1975) sendo um dos componentes do plasma que tem sido largamente estudado existindo sobre ela numerosas revisões (PUTNAM, 1965; JANATOVA, 1974; PETERS, 1975). Apesar do acúmulo de conhecimentos sobre suas propriedades físico-químicas, incluindo sua estrutura primária (BEHRENS, SPIEKERMAN and BROWN, 1975), não foi possível até o presente, encontrar-se um método de purificação que pudesse ser utilizado pela maioria dos laboratórios medianamente equipados, justificando assim os esforços recentes (PETERS, TANIUCHI and ANFENSEN, 1973; WICHMAN and ANDERSON, 1974; SCHNEIDER et al., 1975) no sentido do estabelecimento de novos métodos de purificação.

Baseado numa das características da albumina, como proteína solúvel em água, um dos primeiros métodos propostos para seu isolamento, foi através de diálise contra água (DENIS, 1840). Sabemos atualmente que outras proteínas tais como as pseudoglobulinas, também apresentam essas características, o que torna esse método impraticável para a obtenção de frações puras.

A precipitação de proteínas por 'salting-out' tem sido largamente utilizada com vantagens para separação de algumas proteínas. Nestes processos se utiliza principalmente sulfato de amônio por ser este sal altamente solúvel em água e permitir a obtenção de soluções de força iônica elevada. Pode-se precipitar preferencialmente uma determinada proteína presente em uma mistura, controlando-se a força iônica da solução, podendo o sal ser retirado por uma simples diálise. As proteínas isoladas por esse método aparentemente mantêm sua conformação nativa porquanto PETERSON e SOBER em 1961 verificaram que não ocorrem variações cromatográficas no comportamento de proteínas do soro humano após tratamento com sulfato de amônio, apresentando-se as frações eluídas no cromatograma na mesma posição que as do soro não tratado.

O sulfato de amônio tem sido utilizado para a obtenção de albuminas de várias espécies animais podendo em alguns casos obter-se um produto cristalizado. No caso de albumina equina, ADAIR e ROBINSON (1930) mostraram que esta proteína cristaliza facilmente na presença de sulfato de amônio a 50% de saturação, ajustando-se o pH para 4,9 com ácido acético. O produto obtido nas primeiras cristalizações contém ainda uma percentagem de contaminantes provavelmente adsorvidos à superfície dos cristais. Utilizando cristalizações sucessivas é possí-

vel obter-se um produto considerado puro do ponto de vista imunoquímico. Experiências no nosso laboratório mostraram que em cada recristalização obtém-se apenas 50% da albumina presente em solução. Como são necessárias 5 recristalizações para obtenção de um produto imunoquimicamente puro, o rendimento final é da ordem de 6%.

A albumina bovina não cristaliza nestas condições e a albumina humana cristaliza somente na presença de sulfato de amônio a 75% de saturação, pH 4,9 com H_2SO_4 0,1N (KENDALL, 1941) porém o processo requer períodos longos para cristalização e o rendimento é baixíssimo.

Segundo COHN, HUGUES e WEARE(1947) as diferenças nos aspectos de cristalização das diferentes espécies de albumina estariam relacionadas com diferenças na estrutura polipeptídica das albuminas ou quantidade de lipídios e carboidratos presentes, existindo indicações que os ácidos graxos na molécula facilitam a cristalização (KENDALL, 1941).

COHN et al., (1946, 1947) padronizaram condições para a cristalização de albumina humana a partir de soluções concentradas desta proteína. Este método que utiliza etanol como agente precipitante requer controle rígido da concentração proteica, da força iônica, do pH, da quantidade de etanol e da temperatura. Esse último pa

râmetro é extremamente crítico, devendo as misturas ser processadas a $-5^{\circ}\text{C} \pm 0,1$ próximo ao ponto de congelação a fim de evitar o efeito desnaturante do álcool. Este método industrial para a obtenção de albumina dificilmente pode ser utilizado num laboratório medianamente equipado em razão do alto custo operacional representado pelo equipamento necessário ao controle da temperatura dentro dos limites propostos durante todo o processamento. Ademais, cristalização não é um critério de pureza já que eventualmente são arrastadas outras proteínas no processo. Essas proteínas adsorvem-se à superfície dos cristais podendo continuar contaminando esses cristais, a despeito de sucessivas recristalizações.

Tendo em vista essas dificuldades, LEVINE (1954) e SCHWERT (1957) propuseram o uso do ácido tricloroacético para precipitação de albumina, sendo posteriormente extraído pelo etanol. Porém o emprego de precipitantes ácidos requer rigorosos controles, devido à microheterogeneidade das moléculas de albumina. Essa microheterogeneidade tem sido explicada por FOSTER (1960) admitindo que em pH 2 a 4 ocorre a expansão da molécula com exposição de regiões hidrofóbicas diminuindo sua solubilidade em água e tornando-a mais solúvel em ácido acético e etanol. Essa transição N-F (normal para "fast-migrating") é parcialmente reversível, contudo o tratamento de albumina, mesmo em condições brandas com áci-

dos fortes ou álcoois leva a alterações praticamente irreversíveis da molécula. Por esta razão métodos que utilizam tratamentos drásticos como o proposto por PETERS, TANIUCHI and ANFINSEN (1973) devem ser evitados. Este método, que se baseia na propriedade que a albumina tem de ligar-se a ácidos graxos, consiste essencialmente em uma cromatografia de afinidade utilizando-se resíduos apolares conjugados a um suporte insolúvel, seguido de eluição com 50% de álcool-ácido-acético em pH 3,0.

Também baseado na afinidade cromatográfica o método de WICHMAN e ANDERSON (1974) embora não utilize condições drásticas como o de PETERS, TANIUCHI e ANFINSEN (1973), realiza a eluição com caprilato de sódio que possui grande afinidade pela albumina. Este reagente é utilizado no método de COHN para proteger a albumina de desnaturação, quando a fração V é aquecida a 60°C, por 10 horas, para inativar o vírus da hepatite, SCHNEIDER et al., em 1975, descrevem um método onde utilizam este reagente para proteger a albumina durante o aquecimento do soro até 68°C, para precipitar as outras proteínas do soro. Ao sobrenadante é adicionado polyetilenoglycol sendo obtida uma fração concentrada de albumina humana. Apesar da simplicidade do método, a ligação da albumina ao caprilato de sódio mostra-se irreversível, funcionando o mesmo como hapteno, alterando a imunoreatividade da molécula nativa, como demonstram os trabalhos de GOLDE, MC GINISS e HOLLAND (1971).

O conjunto das informações disponíveis mostra que a obtenção de albumina humana pura em laboratórios me dianamente equipados ainda constitui um problema não resolvido. Por esta razão procuramos verificar no presente trabalho a possibilidade de obter uma albumina imunoquimi ca mente pura, utilizando uma metodologia disponível na maior parte dos laboratórios de pesquisa.

MATERIAL E MÉTODOS

REAGENTES: Os reagentes usados tem a especificação de quimicamente puros. A acetona foi redestilada a 56°C no laboratório. O éter livre de peróxido foi obtido por lavagens sucessivas com solução saturada de sulfato ferroso e conservando a -20°C. Soluções saturadas de sulfato de amônio foram tratadas com carvão ativado, filtradas, adicionado EDTA e cristalizadas. Os cristais foram lavados em água deionizada gelada e posteriormente dissolvidos de modo a preparar soluções saturadas. A partir desses o material era recristalizado duas vezes antes do uso.

As soluções tampão foram preparadas segundo as indicações de GOMORI (1955).

OBTENÇÃO DE SORO HUMANO: Sangue humano, impróprio para transfusões por apresentar reações positivas para doença de Chagas e sífilis, colhido assepticamente em anticoagulante, foi cedido pelo Banco de Sangue da Santa Casa de Campinas. Estes sangues eram centrifugados a 700g durante 20 min. para separação de hemácias e o plasma obtido de diferentes doadores era misturado e guardado em congelador a -20°C. O fibrinogênio desses plasmas foi retirado por descongelamento lento e centrifugação a 4800g durante 30 min. Essa etapa foi repetida quatro vezes e o soro guardado em congelador até o momento de uso.

IMUNE-SOROS: Para obtenção de soros anti-albumina humana, seis coelhos foram imunizados com albumina humana "Bhering", segundo o seguinte esquema de imunização: 1^a dose, subcutânea no dorso, 10 mg/ml de proteína (1 ml), com adjuvante de Freund completo; 30 dias após, 2^a dose com 10 mg/ml subcutânea no dorso com adjuvante de Freund completo. Após 11 dias, 3^a dose, intraperitoneal com 10 mg de antígeno puro. No dia seguinte foi iniciada uma série de inoculações endovenosas (veia marginal da orelha) realizadas a cada 2 dias com 1 ml do antígeno precipitado pelo alumen (KABAT e MAYER, 1964) contendo as seguintes concentrações de proteína: 1^a semana 1 mg/ml; 2^a semana 2 mg/ml; 3^a semana 5 mg/ml.

Para obtenção de soros anti-soro humano total, 3 coelhos foram imunizados segundo o seguinte esquema: antígeno dissolvido em salina (10 mg/ml), misturado a igual volume de adjuvante de Freund completo, sendo inoculado 1 ml da mistura em cada pata posterior, próximo aos linfonodos. A 2^a dose, 15 dias após, foi de 0,5 ml da mesma mistura em cada um dos 4 pontos no dorso por via subcutânea. Após 35 dias foi injetado por via intraperitoneal, 20 mg do antígeno puro em NaCl 0.15 M. Após 24 horas, iniciou-se inoculação por via endovenosa do antígeno precipitado pelo alumen com doses crescentes de 1,2 e 3 mg/ml 3 vezes semanalmente. Os animais foram sangrados até 7 dias após a última injeção.

OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ALBUMINA: Com o objetivo de obter uma fração rica em albumina, foram realizadas várias experiências de precipitação do soro humano com solução de sulfato de amônio, procurando-se obter a fração precipitável entre 50 e 75% de saturação, seguindo-se as indicações de KABAT e MAYER (1964): a um volume de soro, foi adicionado igual quantidade de água destilada e lentamente, gota a gota, sob agitação, dois volumes da solução saturada de sulfato de amônio a pH 7,0. A precipitação foi realizada em banho de gelo. A mistura permaneceu 30 min. em repouso e a seguir foi centrifugada a 700 g durante 30 min. O precipitado obtido a 50% de saturação contendo globulinas, foi isolado. A quantidade de sal sólido necessária para atingir 75% de saturação foi calculada e adicionada ao sobrenadante, lentamente. Após 30 min. a mistura foi centrifugada a 3 020g no sistema de fluxo contínuo. O precipitado obtido foi dialisado e a seguir liofilizado.

IMUNODIFUSÃO: As condições de imunodifusão em agar seguiram as recomendações descritas por OUCHTERLONY (1967).

ELETROFORESE E IMUNOELETROFORESE: A eletroforese foi realizada utilizando-se tampão veronal pH 8,6.

A eletroforese em acetato de celulose foi realizada com tampão 0,05M utilizando 2mA por fita durante 45 min.

As experiências de imunoeletroforese em gel de agar foram realizadas utilizando-se na cuba o mesmo tampão 2 vezes mais concentrado e um gradiente de potencial de 4V/cm por 90 min.

Para imunoeletroforese bidimensional em agarose a 1% foram seguidas as recomendações de AXELSEN, KROLL e WEEKE (1973) utilizando-se na 1^a dimensão um gradiente de 7 V/cm durante 90 min, e na 2^a 2 V/cm durante 15 h. A seguir as lâminas foram tratadas segundo os procedimentos descritos por CLARKE (1971).

DOSAGEM DE PROTEINAS: O teor de proteínas foi determinado utilizando o reativo do biureto segundo WEICHSELBAUM (1946) e pela absorbância nos comprimentos de onda de 280 nm em espectrofotômetro Zeiss PMQ II, utilizando-se cubas de quartzo com 1 cm de caminho ótico.

CROMATOGRAFIA: Cromatografias em resinas de troca iônica, di-etil-amino-etil celulose e carboximetil-celulose foram realizadas segundo as instruções de SOBER e PETERSON (1958). As frações obtidas por cromatografia, quando necessário foram dialisadas contra água destilada e liofilizadas.

CATEPSINA D DE BAÇOS DE COELHOS: A catepsina D de baço de coelho foi obtida e dosada segundo o método descrito

por DAWOOD (1973).

DIGESTÃO DA SORO ALBUMINA HUMANA E OBTENÇÃO DO FRAGMENTO INIBIDOR I(H): A digestão de SAH foi realizada segundo a técnica descrita por LAPRESLE (1955) e o fragmento I(H) obtido a partir dos digestos de SAH pela catepsina D, seguindo-se as instruções fornecidas por LAPRESLE et WEBB (1960).

REAÇÕES DE HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA: Hemácias de carneiro taninizadas foram preparadas segundo as recomendações de BOYDEN (1951) e sensibilizadas com 100 µg de proteína para cada ml de suspensão a 2,5% segundo BORDUAS and GRABAR (1953). As leituras foram feitas 2 e 12 horas após incubação da mistura e os títulos foram expressos pelo inverso da maior diluição apresentando reação positiva.

RESULTADOS

1. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ALBUMINA 75%

Com o objetivo de se obter uma fração rica em albumina, várias experiências de precipitação do soro humano com sulfato de amônio foram realizadas, como é mostrado na tabela I, onde se verificou ser possível a obtenção de uma fração contendo em torno de 80% de albumina com um rendimento geral médio de 70%. O conteúdo de albumina foi calculado por densitometria do eletroferograma do soro e da fração enriquecida.

TABELA I - Experiências realizadas para obtenção da fração alb.75%.

SORO HUMANO			FRAÇÃO ALBUMINA 75%		
Volume (ml)	Concentração proteica (mg/ml)	Conteúdo de albumina (%)	Proteínas totais (g)	Conteúdo de albumina (%)	Rendimento final (%)
160	63	43	3,6	83	69
320	52	42	6,1	73	63
650	75	40	14,0	85	63
450	47	43	9,0	74	77
1650	50	50	36,0	84	73
1450	60	42	34,0	80	76
2000	66	48	50,0	87	68

2. CROMATOGRAFIAS

Várias experiências foram realizadas com o objetivo de se verificar a possibilidade de a partir da fração alb.75% da experiência anterior, obter-se albumina imunoquimicamente pura, através de uma única cromatografia de troca iônica.

2.1. Cromatografias em DEAE-celulose.

Experiências com DEAE-celulose equilibrado com tampão fosfato de potássio a pH 7,0 em diferentes molaridades, em coluna de 2x30 cm, mostraram que quando se utilizou o tampão com molaridade próxima a 0,25 M não havia fixação da fração albumina à coluna. Partindo de uma molaridade inicial de 0,01M e utilizando gradiente linear de concentração (200 ml) com tampão final 0,25M, foram obtidas 3 frações (fig. 1) que continham albumina em mistura com outras proteínas. Utilizando-se um tampão inicial de 0,05 M com um gradiente linear (200ml) para 0,25 M, obteve-se a albumina distribuída em três diferentes frações, como pode ser visto na figura 2, que se mostraram contaminadas com diferentes componentes.

A alteração do volume utilizado no gradiente, (o dobro do volume) para 400 ml, não modificou sensivelmente os resultados (fig. 3) quanto à pureza das frações obtidas. Igualmente a variação de fluxo entre 23 e 200 ml também não alterou significativamente os resultados.

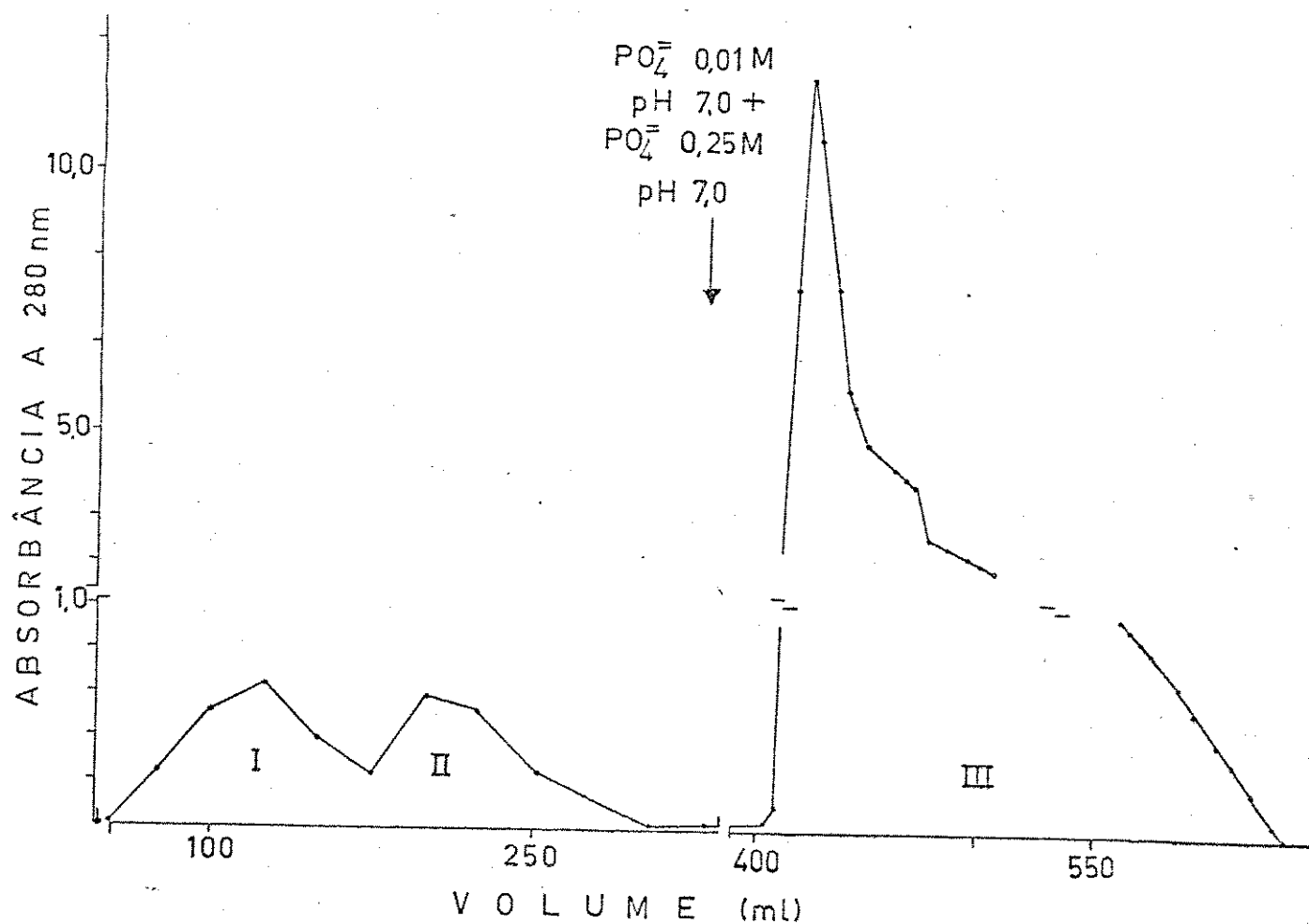


Fig. 1 - Cromatografia da fração alb. 75% em coluna 2x30 cm de DEAE-celulose equilibrado com tampão fosfato de potássio 0,01 M pH 7,0. Aplicados 12 ml de proteína a 66mg/ml. Após eluição da fração I e II, foi iniciado no tubo 60 um gradiente linear (200 ml) de tampão fosfato de potássio 0,25 M pH 7,0. O fluxo foi de 20 ml/h.

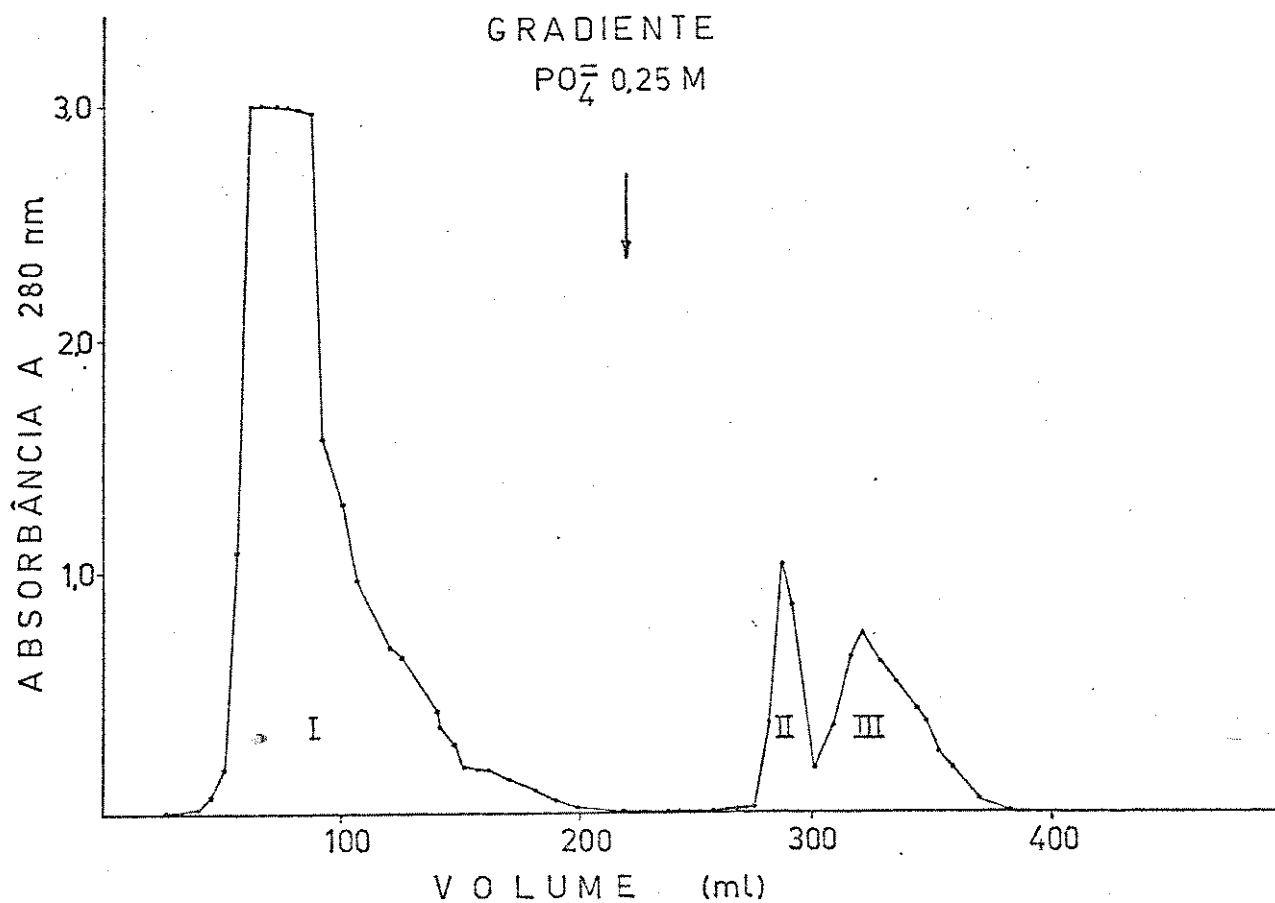


Fig. 2 - Cromatografia da fração alb. 75% em coluna de 2x30 cm de DEAE-celulose equilibrado com tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,0. Foram aplicados 10 ml (63mg/ml) de proteína e o fluxo foi de 100 ml/h sendo coletados 5 ml em cada tubo. No tubo 50, iniciou-se um gradiente linear (200 ml) de tampão fosfato de potássio 0,25 M.

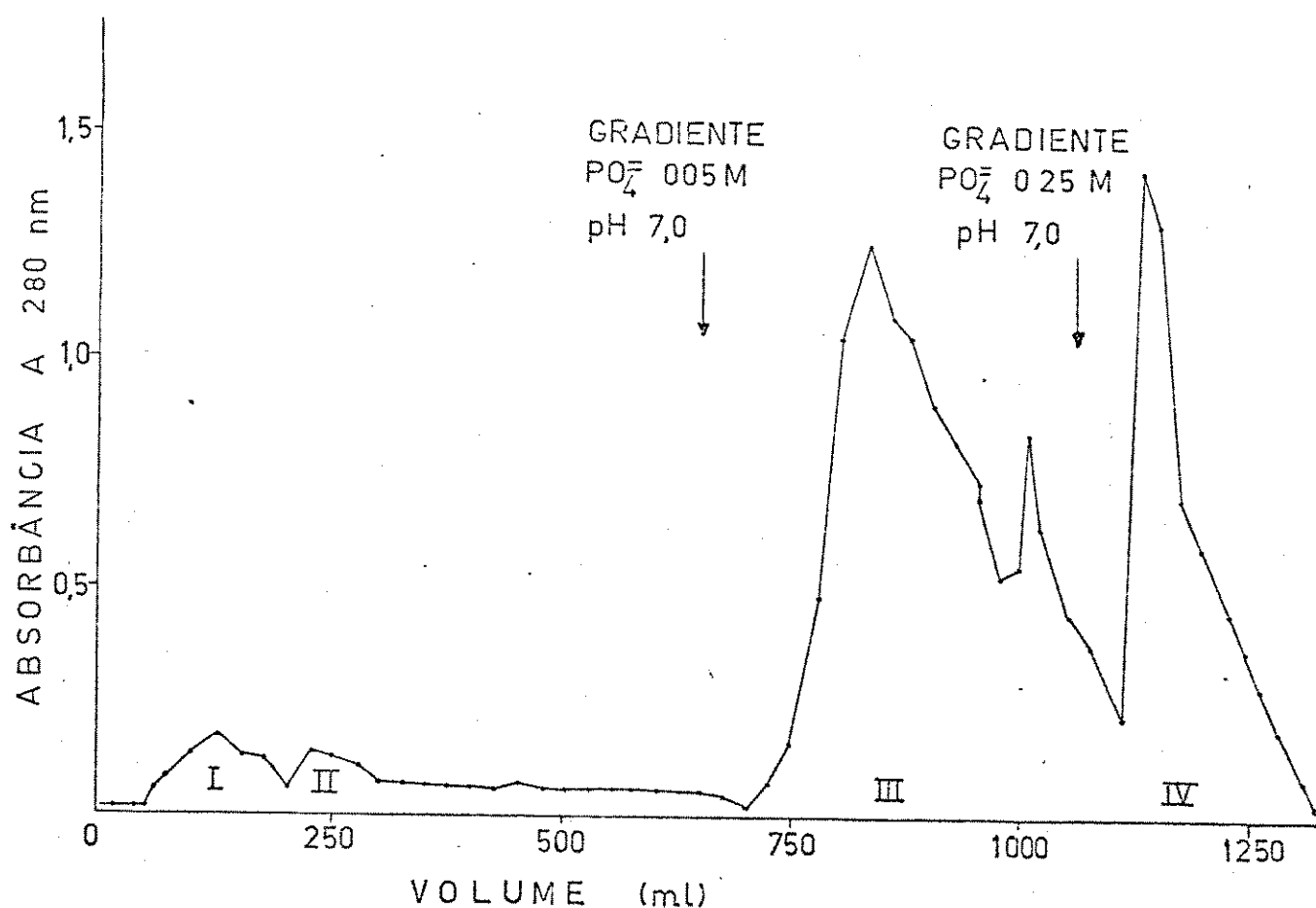


Fig. 3 - Cromatografia da fração alb. 75% em coluna de 2x30 cm de DEAE-celulose equilibrada com tampão fosfato de potássio 0,01 M pH 7,0. Foram aplicados 11 ml da fração concentrada em albumina (70 mg/ml). Frações foram coletadas com um volume de 5 ml, iniciando-se no tubo 130, um gradiente linear para tampão fosfato de potássio (400 ml) 0,05 M pH 7,0. Após eluição das 3 frações teve início um gradiente linear (200 ml) para tampão fosfato 0,25 M sendo eluída a fração IV. O fluxo foi de 23 ml/h.

2.2. Cromatografias em CM-celulose:

Não tendo sido obtida albumina humana pura, por um único passo em cromatografia com DEAE-celulose, nas condições descritas anteriormente, iniciou-se a padronização em CM-celulose. Para as experiências descritas a seguir foram utilizadas colunas de 2x30 cm equilibradas com tampão ácido-acético-acetato com diferentes molaridades e pH variando entre 4,7 a 5,0.

As experiências em pH 4,7 mostraram que a totalidade das proteínas permanece retida à coluna quando se empregava a molaridade inicial de 0,005 M mesmo quando se utilizava um fluxo de 180 ml/h. Aplicando-se a estas colunas um gradiente linear (100 ml) para NaCl 0,25 M foram obtidas 4 frações (fig. 4) contendo albumina, porém essas frações apresentavam-se contaminadas com 2 ou 3 antígenos diferentes.

Utilizando-se colunas equilibradas com tampão ácido-acético-acetato 0,05 M e mantendo-se um fluxo de 60 ml/h, verificou-se que parte do material aplicado não era adsorvido à coluna. O restante do material que ficou fixado à coluna foi eluído através do sistema "stepwise" com porções de 150 ml de tampão nas seguintes molaridades: 0,10; 0,15 e 0,20 M; obtendo-se assim mais três diferentes frações (Fig. 5). A análise imuno-eletroforética das frações assim obtidas mostrou que

a primeira fração (I) continha albumina imunoquimicamente pura (fig. 7) enquanto que as demais frações continham albumina contaminada com outros antígenos. Experiências similares à anterior utilizando-se tampão ácido-acético-acetato a pH 5,0, mostraram idênticos resultados.

O conjunto dos resultados obtidos mostrou que era possível obter-se albumina imunoquimicamente pura, utilizando-se uma única cromatografia nas seguintes condições; CM-celulose equilibrado com tampão ácido-acético-acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0. Diminuindo-se o fluxo de 60 para 15 ml/h, o material ficava retido à coluna e aumentando-se para 120 ml/h a albumina é eluída com contaminantes.

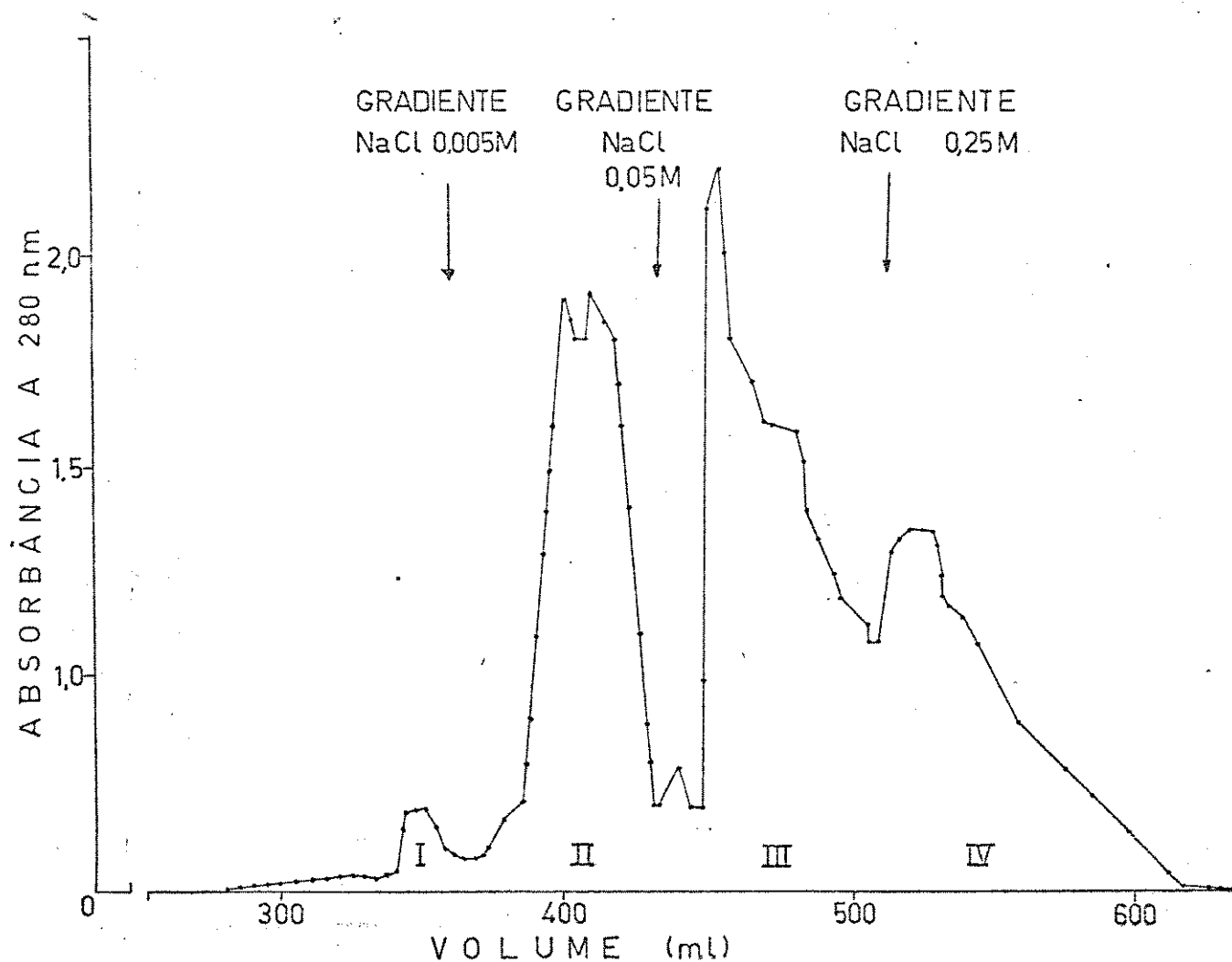


Fig. 4 - Cromatografia da fração alb. 75% em coluna de 2x30 cm de CM-celulose equilibrado com acetato de sódio 0,005 M pH 4,7. Foram aplicados 16 ml(85 mg/ml), sendo o volume coletado por tubo de 5 ml. No tubo 70 iniciou-se um gradiente linear (200 ml) para NaCl 0,005 M. Após eluição da fração II, teve início no tubo 90 um gradiente do mesmo volume de NaCl 0,05 M. Ao término foi aplicado um gradiente para NaCl 0,25 M. O fluxo foi de 180ml/h.

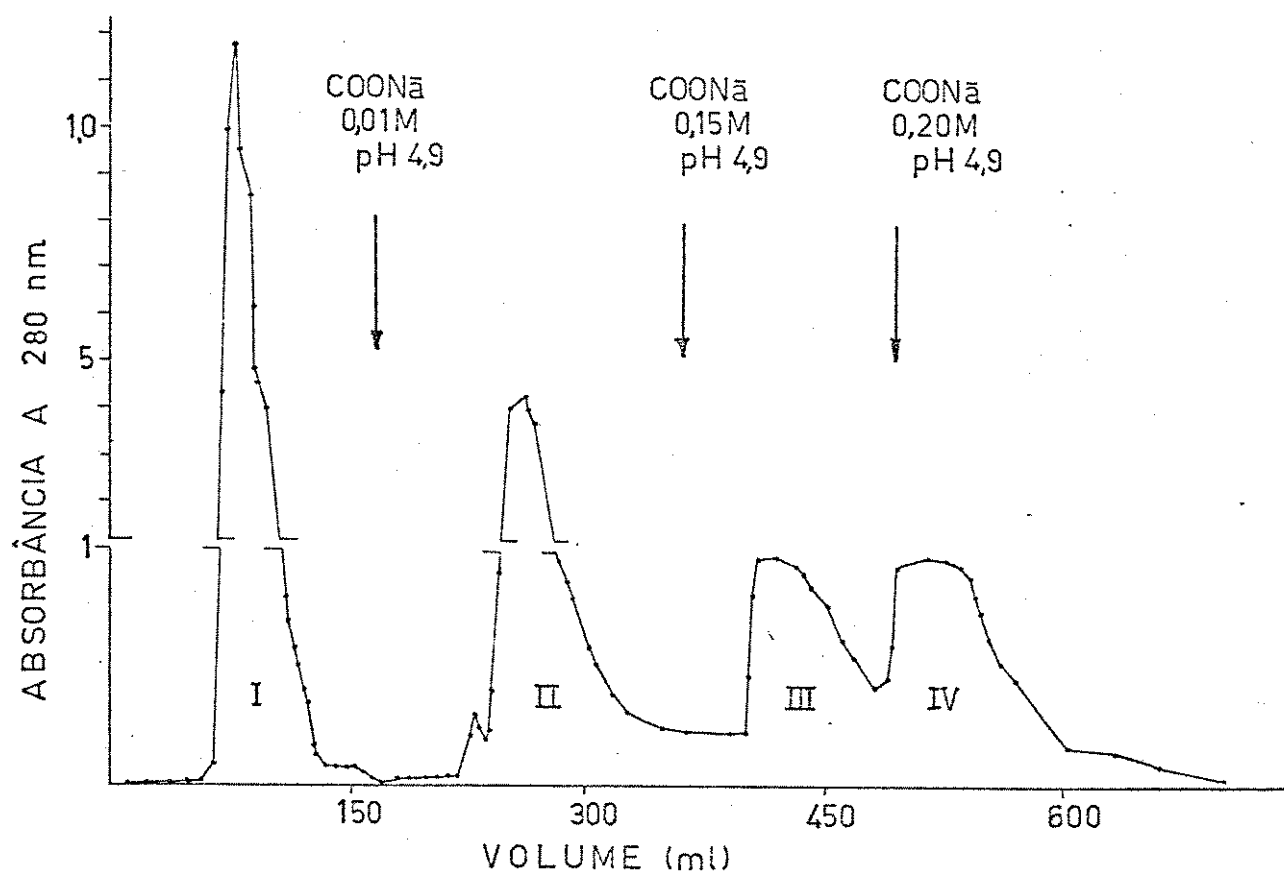


Fig. 5 - Cromatografia da fração al b. 75 % em CM-celulo se equilibrado com tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,9. Foram aplicados 22 ml (65 mg/ml) com um fluxo de 60 ml/h. Frações foram coletadas num volume de 3 ml por tubo. No tubo 60 teve início "stepwise" do mesmo tampão 0,10 M (150 ml). No tubo 120, 0,15 M e no tubo 160, 0,20 M.

Os dados obtidos utilizando-se um acetato de sódio de determinada marca, rotulado como pró-análise, acham-se representados na tabela II, onde se pode verificar que em nenhuma das condições utilizadas foi possível obter-se resultados homogêneos. Quando se utilizou um acetato de sódio da mesma marca utilizada na experiência inicial, foi possível obter resultados reprodutíveis tanto em relação à pureza, quanto ao rendimento (tabela III).

TABELA II - Cromatografias da fração alb.75% realizadas em colunas de CM-celulose equilibradas com tampão ácido-acético-acetato de sódio 0,05M pH 5,0.

Quantidade de prot.	Concentração	Dimensões da coluna	Fluxo	Rendimento	Resultado do controle imunoeletroforético.
(g)	(mg/ml)	(cm)	(ml/h)	(%)	
7,2	87	5x40	300	8	pura
6,0	98	5x40	300	13	pura
9,0	98	5x40	500	40	contaminada
10,0	143	5x40	500	42	"
9,0	90	5x40	500	34	"
1,8	75	2x40	60	32	"
8,1	92	5x40	300	10	"
2,4	80	2x40	60	10	pura
1,6	64	2x40	60	27	contaminada
8,1	60	5x40	500	41	"

Na tabela III pode-se verificar que os resultados obtidos mostraram-se homogêneos. O gráfico dessas cromatografias é mostrado na figura 6. Controles eletroforéticos mostram que a albumina humana pura foi eluída, como pode ser visto na figura 7 por imunoeletroforese bidimensional.

TABELA III - Cromatografias da fração alb. 75% realizadas em colunas de CM-celulose equilibradas com tampão ácido acético- acetato de sódio 0,05 M pH 5,0, com um fluxo de metade do volume da coluna por hora.

Quantidade de prot. (g)	Concentração (mg/ml)	Dimensões da coluna (cm)	Rendimento (%)	Controle imunoeletroforético.
2,2	76	2x30	43	pura
1,7	60	2x30	42	"
2,1	66	2x30	44	"
1,6	52	2x30	42	"
2,1	66	2x30	46	"
8,0	80	5x40	46	"
1,9	60	2x30	41	"

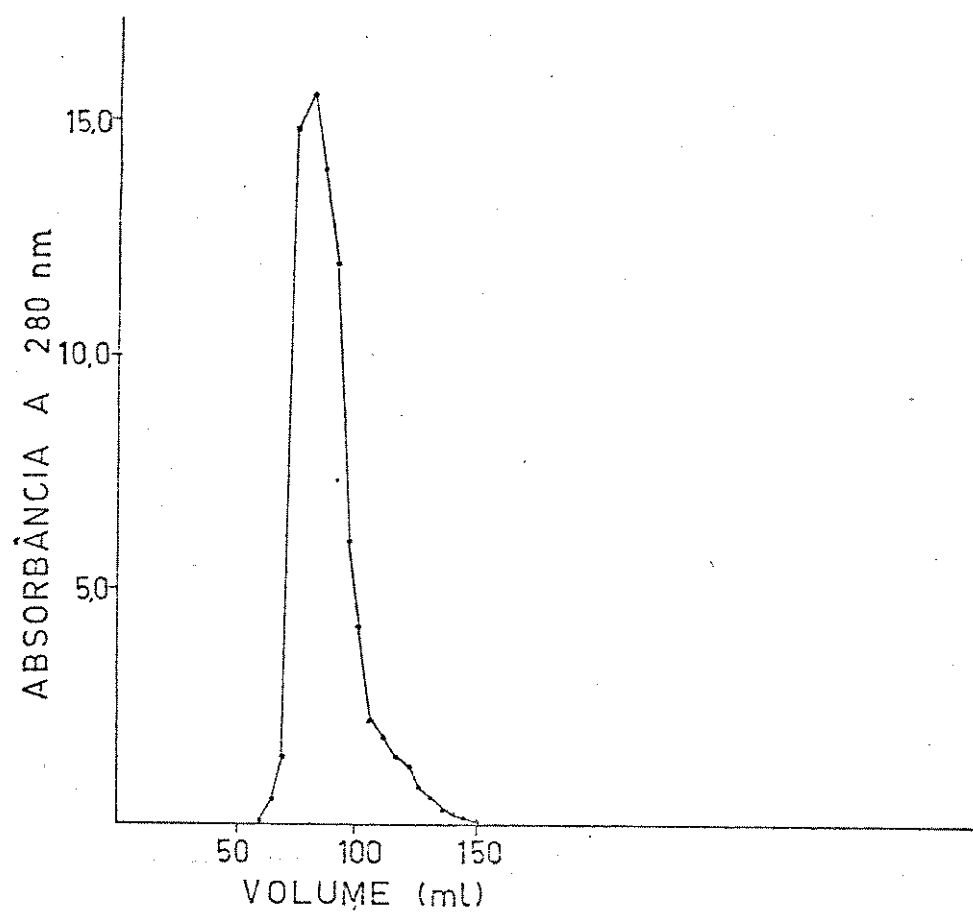
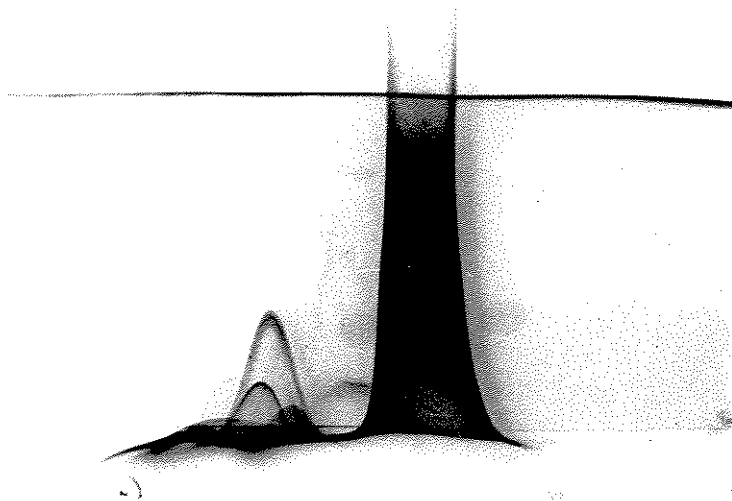


Fig. 6 - Cromatografia da fração concentrada em albumina, em CM-celulose equilibrado em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0. Foram aplicados 20 ml de proteína com 65 mg/ml, com um fluxo de 60 ml/h.

A



B

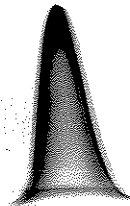


Fig. 7 - A: Imunoeletroforese bidimensional do soro humano total a 3 mg/ml.

B: Imunoeletroforese bidimensional da fração albumina purificada a 2 mg/ml. Imune-soro: soro de coelho anti-soro humano total diluído a 1/10.

3. DIGESTÃO DE SORO ALBUMINA HUMANA PELA CATEPSINA D:

Com o objetivo de se verificar a possibilidade de obtenção de fragmentos imunologicamente ativos, a partir da albumina obtida em nosso laboratório, partidas de 2 g de SAH foram submetidas à ação da catepsina D conforme descrito em material e métodos. A análise dos digestos obtidos, através de eletroforese em agar (fig. 8) e imunoeletroforese bidimensional (fig.9) mostrou que a albumina obtida em nossas condições se comporta de maneira idêntica à obtida comercialmente.

A HSA bem como o fragmento I(H) dela obtido por proteólise, testados quanto à sua atividade imunológica por hemaglutinação passiva, se comportam de maneira idêntica respectivamente à HSA obtida comercialmente e seu fragmento (tabela IV).

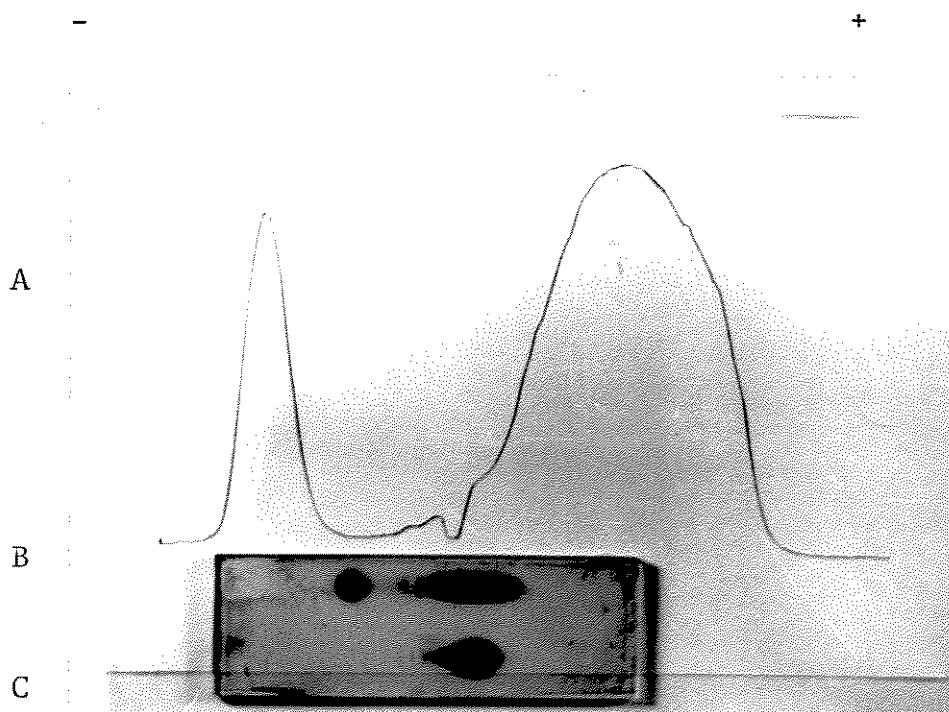


Fig. 8: A: Perfil da densitometria da soro albumina hu
mana digerida.

B: Eletroforese da soro albumina humana digerida

C: Eletroforese da albumina humana purificada.

Concentração proteica das frações= 12mg/ml.

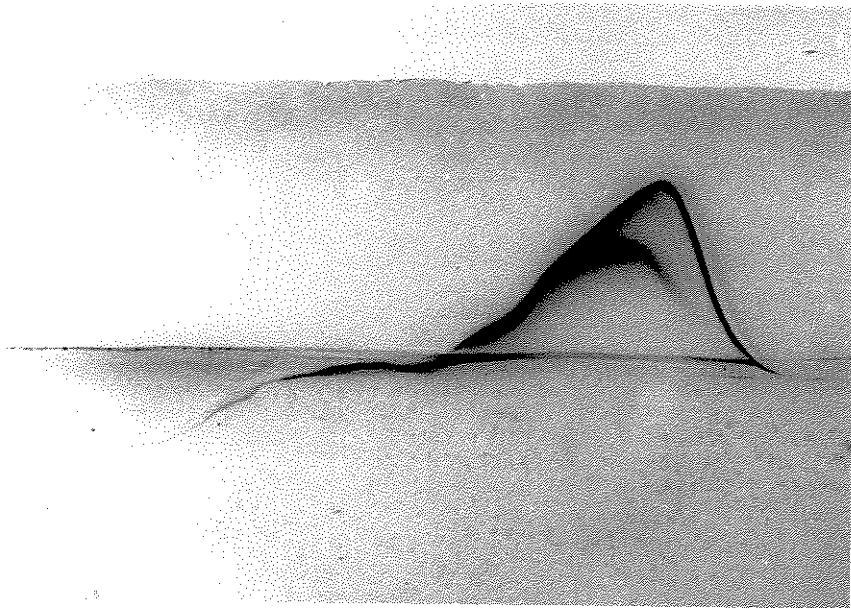


Fig. 9 - Imunoeletroforese bidimensional da soro al-
bumina humana digerida pela catepsina D de
baço de coelho na concentração de 6 mg/ml.
Soro de coelho anti-albumina humana diluí-
do a 1/10.

TABELA IV - Títulos dos soros anti-SAH obtidos por hema
glutinação passiva frente a hemácias sensi-
bilizadas com HSA ou I(H).

Soros	Antígenos	
	HSA	I (H)
1	800	64
2	400	64
3	8000	1024
4	3200	256
5	8000	512
6	8000	1024
7	32000	4096

Controles negativos: salina + hemácias sensibilizadas
soros + hemácias taninizadas.

DISCUSSÃO

A albumina do soro tem sido largamente utilizada para o estudo de determinantes antigênicos proteicos, por apresentar uma série de vantagens tais como: baixo peso molecular, ser imunogênica em espécies diferentes e representar aproximadamente 60% das proteínas do soro, o que facilita sua obtenção. Vários autores (LAPRESLE, 1955; PETERS, 1964; PORTER, 1957) tem estudado os fragmentos obtidos através da proteólise. LAPRESLE (1955) submetendo a SAH a ação da catepsina D, obteve um fragmento de PM 11.000, que foi denominado inibidor I(H) por que embora não apresentasse atividade precipitante frente ao anticorpo, era capaz de inibir a reação entre a SAH e anti-SAH. A digestão trípica de I(H) permitiu o isolamento de outro fragmento de PM 6 600(F1), (LAPRESLE and WEBB, 1965) caracterizado como um determinante antigênico pela purificação de anti-F1 que frente a SAH nativa formam um complexo de fórmula AcAg mesmo em excesso de anticorpo como revelado por ultracentrifugação.

A estrutura da albumina é bem preservada no inibidor e no fragmento F1, como é provado por sua capacidade de reagir com anticorpos anti-SAH (LAPRESLE and GOLDSTEIN, 1969; LAPRESLE and WEBB, 1960). A composição e a sequência de amino-ácidos de F1 da SAH, foi determi

nada por BELLON e LAPRESLE(1975) fornecendo dados fundamentais para a determinação da sequência primária e de modelos de conformação para a molécula nativa (BEHRENS, SPIEKERMAN and BROWN, 1975).

RANGEL(1965,1967) demonstrou a existência de reações cruzadas entre os fragmentos obtidos de SAH, SAB e SAE, comprovando que esses determinantes antigênicos são semelhantes entre si, mas não idênticos, verificando que o antígeno homólogo desloca o heterólogo.

O isolamento desses fragmentos de baixo peso molecular, que reagem cruzadamente, permitiria a comparação estreita entre esses determinantes antigênicos ao nível de sequência de amino-ácidos e conformação, restringindo as desvantagens do estudo da molécula nativa onde vários determinantes estão envolvidos.

Contudo, o desenvolvimento desses trabalhos em nosso meio se defronta com o problema da obtenção de albumina humana imunoquimicamente pura. Esta albumina só pode ser adquirida através de importação de empresas internacionais, visto que não existe um método de laboratório que permita sua preparação em laboratórios medianamente equipados. A escolha do método defronta-se com a grande dificuldade representada pela complexidade estrutural dos determinantes antigênicos dessas moléculas.

Resultados obtidos com proteínas e peptídeos cuja sequência de amino-ácidos é conhecida, tais como ACTH (DAYOFF and ECK, 1969), angiotensina (OKEN and BIER, 1968), citocromo C (NISONOFF, REICHLIN and MARGOLIASH, 1970), bradicinina (SPRAGG et al., 1967), gastrina (MCGUIGAN, 1968), lisozima (ARNHEIM, SOBEL and CANFIELO, 1971), mioglobina (ATASSI and SINGAL, 1970), ribonuclease (PELICHOVA, SUZUKI, and CINADER, 1970), proteína do vírus do mosaico do tabaco do fumo (RAPAPPORT and ZAITLIN, 1970), insulina (TOUBER et al., 1970), hemoglobina (KRAUSS, 1967) e colágeno (KETTMAN, BENJAMINI and MICHAELI, 1967), indicam que a produção de anticorpos em resposta à imunização por um antígeno proteico pode ser dirigida contra um ou vários aspectos da proteína; isto é sua estrutura primária, secundária, terciária e quaternária, tornando-se evidente a necessidade de manutenção da estrutura nativa (BENJAMINI, MICHAELI and YOUNG, 1972).

Sendo de primordial importância a manutenção de estrutura e conformação semelhante à nativa no estabelecimento de comparações entre a molécula e seus fragmentos, torna-se necessário rigoroso controle nos métodos para obtenção dos mesmos. No presente trabalho utilizamos na 1^a etapa, para obtenção da fração albumina, a precipitação do soro humano pelo sulfato de amônio, obtendo-se um rendimento de 70%. Contrôles eletroforéticos não revelaram diferenças entre a albumina assim obtida e a não tratada.

A cromatografia de troca iônica é um dos principais métodos de separação das proteínas, sendo as moléculas selecionadas por diferenças em seu comportamento ácido-básico. A resina empregada deve apresentar alta capacidade de ligação, permitindo entretanto que a eluição se processe em condições brandas a fim de evitar alterações de integridade da molécula (PETERSON and SOBER, 1956). Por este motivo, a cromatografia de troca iônica foi por nós escolhida para a 2^a etapa de purificação de albumina humana.

Os dados obtidos no presente trabalho, utilizando DEAE-celulose equilibrado com tampão fosfato de potássio com diferentes gradientes lineares de concentração de 0,01 a 0,25 M, mostraram que a albumina é eluída em 3 diferentes frações que contêm também outros componentes. Resultados similares foram obtidos por SOBER e PETERSON (1956, 1958) utilizando tampão fosfato de sódio 0,005 M pH 7,0 e seis diferentes gradientes de NaCl.

Baseado nesses dados, iniciamos experimentos em CM-celulose e verificamos os vários parâmetros envolvidos. Variamos o pH de 4,7 a 5,0 e a molaridade do tampão ácido-acético-acetato de 0,005 a 0,20 M. Os resultados obtidos em CM-celulose mostraram que é possível obter-se albumina humana pura do ponto de vista imunológico em tampão ácido-acético-acetato 0,05 M pH 5,0. Com molaridade 0,005 M permanece retida à coluna e a 0,01 M

é eluída com contaminantes.

Alterações de fluxo mostram diferentes resultados. A fração obtida mostrou-se pura frente a antisoro humano total obtido em coelho, apresentando apenas um sistema precipitante na concentração de 20mg/ml. Nas várias cromatografias realizadas nessas condições (tabela II) verificaram-se alterações de rendimento e pureza do material dos resultados, quando acetato de sódio de procedência diferente do original foi utilizado no preparo do tampão. Variações tão sutis indicam a necessidade extrema do controle de pureza dos reagentes empregados. Essa variação poderia ser devida à presença de diferentes íons.

O presente método descrito apresenta vantagens quando comparado aos já existentes como o de KENDALL (1941) onde o rendimento de albumina obtido é da ordem de 3%, sendo o nosso de aproximadamente 30% de albumina total, calculado sobre a 1^a e 2^a etapas do trabalho. Não são adicionados estabilizantes à proteína como nos métodos de WICHMAN e ANDERSON (1974) ou o de SCHNEIDER et al. (1975), não havendo também variações bruscas de pH como no método de PETERS, TANIUCHI e ANFINSEN (1973), já que sabemos que todos estes tratamentos alteram a imunoreatividade da molécula.

Outra vantagem é a do aproveitamento de soro humano dos bancos de sangue, o que facilita sobremaneira a aquisição de matéria prima para a obtenção de albumina humana em laboratório.

RESUMO E CONCLUSÕES

Experiências foram realizadas com o sentido de verificar a possibilidade de obtenção de albumina humana imunoquimicamente pura, utilizando-se uma metodologia disponível em laboratório medianamente equipados. Foram utilizados soros humanos obtidos a partir de sangue rejeitado para serviços de transfusão por ser impróprio para uso humano por apresentar reações sorológicas positivas para sífilis ou Doença de Chagas. Estes soros foram fracionados por "salting-out" e por cromatografia e a pureza das frações foi testada por eletroforese em acetato de celulose, imunoeletroforese e imunoeletroforese cruzada.

Os resultados obtidos mostraram que:

1. O fracionamento com sulfato de amônio permitiu a obtenção de uma fração enriquecida em albumina (80%) com um rendimento médio de 70%.

2. Por cromatografia em CM-celulose em condições controladas pode-se obter uma fração que de acordo com os resultados dos testes de pureza utilizados, contém apenas albumina com um rendimento global da ordem de aproximadamente 30%.

3. Experimentos de digestão da albumina obtida com a catepsina D de coelho, mostraram resultados similares aos obtidos com albuminas humanas purificadas, obtidas comercialmente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAIR, G.S. and ROBINSON, M.E. - The specific refraction increments of serum albumin and serum globulin Biochem. J., 24:993, 1930.
- ARNHEIM, N.; SOBEL, J.; CANFIELD, R. - Immunochemical resemblance between human leukemia and hen egg white lysozyme and their reduced carboxymethyl-derivates. In preparation. In: Benjamini, E., Michaeli, D. and Young, J.D. - Antigenic determinants of proteins of defined sequences. Current Topics in Microbiology and Immunology, 58:84, 1972.
- ATASSI, M.Z. and SINGAL, R.P. - Immunochemistry of spermwhale myoglobin. Biochem., 9:3854, 1970.
- AXELSEN, N.H.; KROLL, J. and WEEKE, B. - A manual of quantitative immunoelectrophoresis. Methods and Applications. Edited by Universitetsforlaget, Oslo, Bergin-Tromso, 1973.
- BEHRENS, P.Q.; SPIEKERMAN, A.M. and BROWN, J.R. - Structure of human serum albumin. Fed.Proc., 34(3):591, 1975.
- BELLON, F. and LAPRESLE, C. - Chemical structure of human serum albumin and their location in the albumin molecule. Biochem. J., 147:385, 1975.

BENJAMINI, E.; MICHAELI, D. and YOUNG, J.D.- Antigenic determinants of proteins of defined sequences. Current Topics in Microbiology and Immunology, 58:84, 1972.

BORDUAS, A.G. et GRABAR, P. - L'Hemagglutination passive dans la recherche des anticorps antiproteiques. Ann. Inst. Pasteur, 84:903, 1953.

BOYDEN, S.V. - The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein. J. Exp. Med., 93:107, 1951.

CLARKE, H.G.M. - Two dimensional (Laurell) immuno-electrophoresis for estimation of antigen in relative units - In: Williams, C.A. and Chase, M.W. (Ed.) - Methods in immunology and Immunochemistry - Academic Press, London, V. III, 1971.

COHN, E.J.; STRONG, L.E.; HUGHES, W.L. Jr.; MULFORD, D. J.; AWORTH, J.N.; MELIN, M. and TAYLOR, H.L. - Preparation and properties of serum and plasma proteins. J. Am. Chem. Soc., 68:459, 1946.

-----; HUGHES, W.L. Jr. and WEARE, J.H. - Preparation and properties of serum and plasma proteins. III - Crystallization of serum albumins from ethanol-water mixtures. J. Am. Chem. Soc., 69:1753, 1947.

- DAWOOD, F.A.M. - Estudo sobre a catepsina D de coelho, purificação e preparação de anti-soro monoespecífico. Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1973.
- DAYOFF, M.O. and ECK, R.V. - Atlas of protein sequence and structure. Silver Spring. Maryland National Biomedical Research Foundation, 1969.
- DENIS, P.S. - Mémoire sur le Sang. Ballière et Fils, Paris, 1840. In: Putnam, F.W. (ed.) - The Plasma Proteins, 2nd ed., vol. I, Academic Press, New York and London, 1975.
- FOSTER, J.F. - In: Putnam, F.W. (ed.) - The Plasma Proteins, 2nd. ed., Vol. I, Academic Press, New York, 1960.
- GOLDE, D.W.; MCGINNISS, M.G. and HOLLAND, P.V. - Serum agglutinins to commercially prepared albumin. Amer. J. Clin. Path., 55:655, 1971.
- GOMORI, G. - Preparation of buffers for use in enzyme studies. In: Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. Methods in Enzymology. Academic Press Inc. Publ., N.Y., 1955.
- JANATOVA, J. - On the heterogeneity of serum albumin: a critical review. J. Med. Exp. Clin., 5:149, 1974.

- KABAT, A. and MAYER, M. - Experimental Immunochemistry
first ed., Charles C. Thomas Publisher, Springfield,
Illinois, USA, 1964.
- KENDALL, F.E. - Studies on human serum proteins. II -
Crystallization of human serum albumin. J.Biol.Chem.,
138:97, 1941.
- KETMAN, J.R., BENJAMINI, E. and MICHAELI, D. - The
synthesis and immunological activity of a peptide
related end immunological activity of a peptide
related to collagen. Biochem. Biophys. Res. Commun.,
29:623, 1967.
- KRAUSS, L.M. - Antigenic determinants in human hemoglobins:
The polypeptide chain. J. Immunol., 99:894, 1967.
- LAPRESLE, C. and WEBB, T. - Isolation and study of
fragment of human serum albumin containing one of the
antigenic sites of the whole molecule. Biochem. J.,
95:245, 1965.
- - Étude de la dégradation de la sérumalbu-
mine humaine par un extrait de rate de lapin. II -
Mise en évidence de trois groupements différents dans
le motif antigenique de l'albumine humaine et de trois
anticorps correspondents dans le serum de lapin-albu-
mine humaine. Ann Inst.Pasteur, 89:654, 1955.

- et WEBB, T. - Étude de la dégradation de la serumalbumine humaine par un extrait de rate de lapin. VII - Isolament et propriétés d'un fragment d'albumine. Ann.Inst.Pasteur, 99:523, 1960.
- and GOLSTEIN, I.J.- Immunogenicity of a fragment of human serum albumin. J. Immunol., 102:733, 1969.
- LEVINE, S. - Solubilization of bovine albumin in nonaqueous media. Arch. Biochem. Biophy., 50:515, 1954.
- MCGUIGAN, J.E. - Antibodies to the C-terminal tetrapeptide amide of gastrin. Gastroenterology, 54:1012, 1968.
- NISONOFF, A., REICHLIN, M.; MARGOLIASH, E.- Immunological activity of cytochrome C. J. Biol. Chem., 245:940, 1970.
- OKEN, D. E. and BIER, T.V.L. - Biological effective immunization against angiotensin. Amer. J. Physiol., 214:791, 1968.
- OUCHTERLONY, O. - Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis. In: Weir, B.M. (ed.), - Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Sci. Publ., Oxford, pp. 665, 1967.

PELICHOVA, H.; SUZUKI, T.; CINADER, B. - Enzyme activation by antibody. J. Immunol., 104:195, 1970.

PETERS Jr., T. - Isolation and amino acid composition of two peptides fragments from bovine serum albumin. J. Biol. Chem., 240:4, 1964.

----- - Structure, Function and Genetic control. In: Putnam, F.W. (ed) - The Plasma Proteins, 2nd, ed., Vol. I, Academic Press, New York and London, 1975.

-----, TANIUCHI, H. and ANFINSEN, C.B. Jr. - Affinity chromatography of serum albumin with fatty acids immobilized on agarose. J. Biol. Chem., 248:2447, 1973.

PETERSON, E.A. and SOBER, H.A. - Gradient Chromatography of human serum proteins and its application on the examination of "albumin" and "globulin" obtained by ammonium sulfate fractionation. Arch. Biochem. Biophys., 93:428, 1961.

----- and SOBER, H.A. - Chromatography of proteins. I - cellulose ion - exchange adsorbents. J. Am. Chem. Soc., 78, 1956.

PORTER, R.R. - The Isolation and properties of fragment of bovine serum albumins which retains the ability to combine with rabbit anti-serum. Biochem. J., 66(4):677, 1957.

PUTNAM, F.W. - Structure and function of the plasma proteins. In: The Proteins, 2nd ed., edited by Hans Neurath. V. II. Academic Press. New York and London, 1965.

RANGEL, H.A. - Study of the cross-reaction between rabbit anti-bovine serum albumin antibodies and equine serum albumin. Immunol., 8:88, 1965.

----- - Contribuição ao estudo imunoquímico das reações cruzadas entre as soroalbuminas humana, bovina e equina. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1967.

RAPAPORT, I. and ZAITLIN, M. - Conformational changes in the antigenic determinant of tobacco mosaic virus protein resulting from polymerization of the subunits. Virology, 41:208, 1970.

SCHNEIDER, W., LEFEVRE, H.; FIEDLER, H. and McCARTY, L.J.

An alternative method of large scale plasma fractionation for the isolation of serum albumin. Blut., 30(2): 121, 1975.

SCHWERT, G.M. - Recovery of native bovine serum albumin after precipitation with trichloroacetic acid and solution in organic solvents. J.Am.Chem. Soc., 79:139, 1957.

SOBER, H.A. and PETERSON, E.A. - Protein chromatography on ion exchange cellulose. Fed. Proc., 17:1116, 1958.

SPRAGG, J.; SCHROEDER, E.; STUART, J.M.; AUSTEN, N.K.F. and HABER, E. - Structural requirement for binding to antibody of sequence variants of bradykinin. Biochemistry, 6:3933, 1967.

TOUBER, J.; STOLL, R.W.; ENSINCK, J.W. and WILLIAMS, R.H. Immunological studies of the A and B chains of insulin. Diabetes, 119:409, 1970.

WEICHSELBAUM, T.E. - An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. Amer. J. Clin. Path. Tech., 10:40, 1946.

WICHMAN, A. and ANDERSON, L.O. - Purification of human serum albumin by affinity chromatography. Biochim. Biophys. Acta., 372(1):218, 1974.