

LUIS AUGUSTO FERREIRA ROSSA

**Purificação da gonadotrofina coriônica eqüina, do plasma
sanguíneo de éguas prenhes, por cromatografia de
afinidade**

**São Paulo
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LUIS AUGUSTO FERREIRA ROSSA

**Purificação da gonadotrofina coriônica eqüina, do plasma
sanguíneo de éguas prenhes, por cromatografia de
afinidade**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira

São Paulo
2009



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

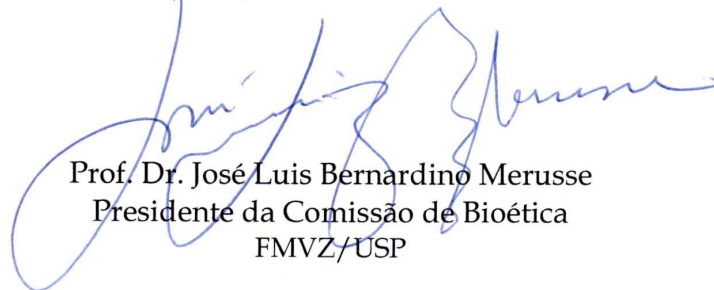
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Extração e purificação da gonadotrofina coriônica eqüina (ECG) do plasma sanguíneo de égua prenhe”, protocolado sob o nº1200/2007, utilizando 20 (vinte) éguas e 45 (quarenta e cinco) ratas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/07.

We certify that the Research “Extraction and purification of equine corionic gonadotrofin (eCG) to pregnant mare sanguineous plasma”, protocol number 1200/2007, utilizing 20 (twenty) horses and 45 (forty five) rats, under the responsibility Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/07.

São Paulo, 19 de outubro de 2007



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ROSSA, Luis Augusto Ferreira

Título: Purificação da gonadotrofina coriônica eqüina, do plasma sanguíneo de éguas prenhes, por cromatografia de afinidade

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Ao amor da minha vida Giselle Ayres pela ajuda, incentivo, amor e compreensão.

Aos meus pais MARIA CRISTINA e MANOEL FERNANDO, e ao meu irmão FERNANDO, por tudo o que significam.

Aos meus AMIGOS pelo companheirismo, de sempre

“Levo a vida devagar para não faltar amor”

Marcelo Camelo

Agora não falta mais!

Guto

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. **Ed Hoffmann Madureira**, com sua amizade e orientação.

Ao Professor Dr. **Mário Binelli**, pelo empréstimo de material e por me incentivar na realização deste projeto.

As Pesquisadoras **Elisabeth Cheng** e **Elisabeth Martins** pela orientação nas etapas de purificação, pela gentileza e generosidade.

A Pesquisadora **Giselle Ayres** por toda ajuda e paciência, em todas as etapas deste projeto.

À Professora Dra. **Claudia Maria Bertan Membrive**, pela ajuda na correção e por todos seus ensinamentos

Ao Professor Dr. **Rubens Paes de Arruda**, pela sessão dos animais.

Ao Professor Dr. **Jose Antônio Visintim** e **Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães** pela ajuda e sessão das instalações do Departamento de Reprodução Animal.

Ao Professor Dr. **Paulo Brandão** pela ajuda e sessão de seu laboratório.

Aos pesquisadores **Roberta, Patrícia, Érica, Daniela e André**, do **Laboratório de Desenvolvimento de Processos do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan**, pela incrível ajuda e companheirismo.

Aos funcionários do VRA, **Miguel, Thaís, Harumi, Marcio, Valdir, Hira e Luis** que sempre estavam prontos a me ajudar.

Aos Irmãos **José de Alencar D'Arcadia Neto, Evandro Luis de Oliveira e Fabiano Orsi da Silva** pelo incentivo, força e paciência.

Aos meus **irmãos de faculdade** e **irmãos de escola** pelos momentos felizes que passamos juntos, sem vocês a vida não teria a menor graça.

À toda minha **família**, meus tios e tias, primos e primas, priminhos e priminhas, vocês são muito importante para mim.

Aos colegas e amigos de pós-graduação, e a todos que estiveram comigo e contribuíram com sua amizade.

As **Empresas Bioxen e Baxter** pelo apoio e doação de materiais utilizados nos experimentos.

E a todos que de alguma maneira me ajudaram e estiveram presentes durante esta importante fase da minha vida.

Muito obrigado!

RESUMO

ROSSA, L. A. F. **Purificação da gonadotrofina coriônica eqüina, do plasma sanguíneo de éguas prenhes, por cromatografia de afinidade.** [Equine chorionic gonadotrophin purification, from pregnant mare plasma, by affinity chromatography]. 2009. 78 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A Gonadotrofina Coriônica Eqüina (eCG) é produzida pela égua prenhe e tem ação folículo estimulante e luteinizante em animais domésticos não eqüídeos. Um "pool" formado por plasma de 4 éguas prenhes, com média de 69 dias de gestação, foi purificado em coluna cromatográfica com resina de afinidade Blue Sepharose FF (BS). As frações que adsorveram à resina BS foram purificadas em coluna cromatográfica com resina de afinidade Concanavalina A 4B (ConA). As frações que não adsorveram à resina BS também foram purificadas em coluna cromatográfica com resina de afinidade ConA. O mesmo "pool" de plasma foi diafiltrado, em cartucho de hemodiálise. O diafiltrado foi aplicado em coluna cromatográfica com resina de afinidade ConA. Atividade biológica (UI/mL) do plasma, do diafiltrado e das frações purificadas foram quantificadas por ensaio biológico com ratas impúbres. As atividades biológicas encontradas no plasma e no plasma diafiltrado foram de 3,63 e 5,14UI/mL, respectivamente. A atividade biológica encontrada nas frações que adsorveram à BS foi de 3,50UI/mL. Não foi encontrada atividade biológica nas frações que não adsorveram à BS. A atividade biológica contida nas frações que adsorveram à BS e que também adsorveram a ConA foi de 3,65UI/mL. O rendimento do processo cromatográfico onde o plasma foi adsorvido pela BS e pela ConA, foi de 69,52%. Não foi encontrada atividade biológica nas frações obtidas da aplicação do plasma diafiltrado em coluna de ConA. O processo cromatográfico com uso de BS seguido de ConA mostrou-se eficaz em purificar a eCG do plasma de éguas prenhes.

Palavras-Chave: Purificação. Gonadotrofina. Gonadotrofina coriônica. Eqüinos. Cromatografia de afinidade.

ABSTRACT

ROSSA, L. A. F. **Equine chorionic gonadotrophin purification, from pregnant mare plasma, by affinity chromatography** [Purificação da gonadotrofina coriônica eqüina, do plasma sanguíneo de éguas prenhes, por cromatografia de afinidade]. 2009. 78 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The equine Chorionic Gonadotrophin (eCG) is produced by the pregnant mare and has follicle-stimulant and luteinizing actions on non-equine domestic animals. A "pool" formed by the plasma of 4 pregnant mares (with mean gestation of 69 days) was purified in chromatographic column with Blue-Sepharose FF affinity resin (BS resin). Fractions adsorbed by BS resin were then purified in chromatographic column with Concanavalin A 4B affinity resin (ConA resin). The fractions not adsorbed by the BS resin were also purified in chromatographic column with ConA resin. The same plasma "pool" was dialyzed in hemodialysis cartridge. The dialyzed was applied in chromatographic column with ConA resin. Biological activities (in IU/mL) of the plasma, of the dialyzed and of the purified fractions were quantified in a biological assay with female rats that did not reach puberty. The biological activities found in the plasma and dialyzed were of 3.63 and 5.14 IU/mL, respectively. Fractions that were adsorbed by BS had a biological activity of 3.50 IU/mL. No biological activity was found in fractions that were not adsorbed by BS. Biological activity found in fractions adsorbed by both BS and ConA was of 3.65 IU/mL. When plasma was both adsorbed by BS and ConA, the chromatographic process yield had results of 69.52%. No biological activity was found in the fractions obtained from the administration of dialyzed plasma in ConA column. The BS - followed by ConA -chromatographic process showed efficacy in purifying the eCG from the plasma of pregnant mares.

Unitemrs: Purification. Gonadotrophin. Chorionic gonadotrophin. Eqüines. Affinity chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1 - Fluxograma de purificação de eCG empregando resina de Blue Sepharose FF e ConA ou somente ConA.....38
- Figura 2 - Esquema de Recirculação para o processo de DF39
- Figura 3 - Gel em poliacrilamida (12%) corado por Coomassie Blue da primeira corrida da purificação de plasma de águas prenhes em resina de Blue Sepharose FF. PMM - Padrão de massa molecular (kDa); eCG -, padrão internacional de eCG; Plasma - “pool” de plasma de 4 éguas prenhes; Canaletas 1 e 2 - frações do Pico 1 - corresponde às frações que contém as proteínas que não foram adsorvidas na coluna; Canaletas 3, 4, 5, 6, e 7 - frações do Pico 2 - corresponde à frações eluidas com o tampão Tris-HCl 20mM contendo NaCl 0,5M.....49
- Figura 4 - Gel em poliacrilamida (12%) corado por Coomassie Blue, da segunda cromatografia do “pool” de plasma de águas prenhes em resina de Blue Sepharose FF. PPM - Padrão de massa molecular (kDa); eCG - Padrão internacional de eCG; Plasma - “pool” de plasma de éguas prenhes; Canaletas 1 e 2 - frações do Pico 3 - corresponde às frações que contém as proteínas que não foram adsorvidas na coluna; Canaletas 3, 4, 5 e 6 - frações do Pico 4 - corresponde à frações eluidas com o tampão Tris-HCl 20mM contendo NaCl 0,5M.....49
- Figura 5 - Gel em poliacrilamida (12%) corado por Coomassie Blue, da purificação em ConA Sepharose 4B da fração que corresponde ao pico eluído da coluna de BS com tampão Tris-HCl contendo NaCl 0,5M. PPM - Padrão de peso molecular, eCG P - Padrão internacional de eCG, eCG C - eCG comercial (Folligon - Intervet-Schering®), Aplic1 - fração eluída da coluna de BS, Canaletas 1, 2, 3, 4, 5 - frações que não adsorveram na ConA (“flow through”), e Canaleta 6 - fração eluída com tampão de 20mM de α -metilglucosídeo52

Figura 6 - Gel em poliacrilamida (12%) corado por Coomassie Blue, da purificação em ConA Sepharose 4B da fração que corresponde ao pico eluído da coluna de BS com tampão Tris-HCl contendo NaCl 0,5M. PPM - Padrão de peso molecular, eCG P - Padrão internacional de eCG, eCG C - eCG comercial (Folligon Intervet-Schering®), Aplic1 - fração eluída da coluna de BS, Canaletas 1, 2, 3, - frações eluídas com tampão de 20mM de α -metilglucosídeo - frações que não adsorveram na ConA ("flow through"), e Canaletas 4, 5 e 6 - fração eluída com tampão de 100mM de α -metilglucosídeo53

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 - Condições experimentais do processo de diafiltração do plasma de éguas prenhes (n = 4) com 60 dias de gestação em média.....	46
Quadro 2 - Diafiltração do plasma em tampão Tris-HCl 0,1M com NaCl, 0,5M e NaN ₃ 0,2%, pH 7,4	46
Quadro 3 - Purificação em resina de afinidade Blue Sepharose FF do plasma de éguas prenhes	47
Quadro 4 - Purificação em resina de afinidade Concanavalina A - Sepharose 4B das frações que adsorveram a BS.....	50
Quadro 5 - Purificação em resina de afinidade Concanavalina A - Sepharose 4B das frações que não adsorveram a BS.....	54
Quadro 6 - Purificação em Concanavalina A - Sepharose 4B do plasma diafiltrado.....	55
Quadro 7 - Média e duplicatas de absorvância e da concentração protéica do padrão de globulina do método de BCA, usadas para constituir a curva de calibração do Gráfico 5.....	68
Quadro 8 - Média e duplicatas de absorvância e da concentração protéica do padrão de globulina do método de BCA, usadas para constituir a curva de calibração do Gráfico 6.....	69
Quadro 9 - Média e duplicatas de absorvância e da concentração protéica do padrão de globulina do método de BCA, usadas para constituir a curva de calibração do Gráfico 7.....	70
Quadro 10 - Média e duplicatas de absorvância e da concentração protéica do padrão de globulina do método de BCA, usadas para constituir a curva de calibração do Gráfico 8.	71

Quadro 11 - Média e duplicatas de absorvância e da concentração protéica do padrão de globulina do método de BCA, usadas para constituir a curva de calibração do Gráfico 9.	72
Quadro 12 - Relação dos animais utilizados para a obtenção da curva de calibração de eCG, com seus respectivos pesos vivos, pesos de seus ovários e peso ovariano corrigido pelo peso vivo (Pov/PV), médias e desvio padrão (DP) da Pov/PV	74
Quadro 13 - Ensaio biológico da diafiltração do plasma com tampão Tris-HCl 0,1M, contendo NaCl 0,5m e NaN3 0,2%, pH 7,4	75
Quadro 14 - Ensaio biológico da purificação do plasma por cromatografia de afinidade em coluna de Blue-Sepharose FF	76
Quadro 15 - Ensaio biológico da cromatografia de afinidade em coluna de ConA-Sepharose 4B com as frações purificadas que adsorveram a Blue Sepharose FF.....	77
Quadro 16 - Ensaio biológico da cromatografia de afinidade em coluna de ConA-Sepharose 4B com a plasma dailisado	78

LISTA DE GRAFICOS

	Página
Gráfico 1 - Cromatograma da purificação de plasma de éguas prenhes em resina de afinidade, Blue Sepharose FF	47
Gráfico 2 - Cromatograma da purificação das frações que adsorveram a BS em resina de afinidade, Concanavalina A - Sepharose 4B.....	51
Gráfico 3 - Cromatograma da purificação das frações que não adsorveram a BS em resina de afinidade, Concanavalina A - Sepharose 4B.....	54
Gráfico 4 - Cromatograma da purificação do plasma diafiltrado, em resina de afinidade, Concanavalina A - Sepharose 4B.....	56
Gráfico 5 - Curva de calibração para quantificação de proteínas contidas no plasma (Antes da DF) e no plasma diafiltrado (Depois da DF), pelo método de BCA.	68
Gráfico 6 - Curva de calibração para quantificação de proteínas contidas no plasma (Plasma) e nas frações purificadas, obtidas da cromatografia de afinidade em coluna de Blue-Sepharose (Picos 1, 2, 3, e 4), pelo método de BCA.	69
Gráfico 7 - Curva de calibração para quantificação de proteínas contidas na Amostra Aplicada 1 e nas frações purificadas, obtidas da cromatografia de afinidade em coluna de ConA-Sepharose 4B (Picos 1, 2 e 3), pelo método de BCA.....	70
Gráfico 8 - Curva de calibração para quantificação de proteínas contidas na Amostra Aplicada 2 e nas frações purificadas, obtidas da cromatografia de afinidade em coluna de ConA-Sepharose 4B (Picos 1, 2 e 3), pelo método de BCA.....	71

Gráfico 9 - Curva de calibração para quantificação de proteínas no plasma diafiltrado e nas frações purificadas, obtidas na cromatografia de afinidade em coluna de ConA-Sepharose 4B (Picos 1, 2 e 3), pelo método de BCA.....	72
Gráfico 10 - Curva de calibração de eCG e valor de R^2 para quantificação de atividade biológica (UI), referente ao ensaio biológico em ratas impúberes.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SILGAS

%	por cento
/	por
®	marca registrada
°C	graus Celsius
α	alfa
β	beta
BS	blue-sepharose
cm	centímetros
ConA	concanavalina A
dCG	gonadotrofina coriônica de jumentas
DF	diafiltração
eCG	gonadotrofina coriônica eqüina
eLH	hormônio luteinizante eqüino
eSA	albumina sérica eqüina
FF	“fast flow”
FSH	hormônio folículo estimulante
g	gramas
h	horas
hCG	gonadotrofina coriônica humana
IATF	inseminação artificial em tempo fixo
kDa	quilodaltons
L	litros
LH	hormônio luteinizante

M	molar
m ²	metro quadrado
mg	miligramas
mL	mililitro
mM	milimolar
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
pH	ponto hidroelétrico
PMSG	gonadotrofina sérica da égua prenhe
SDS	sódio dodecil sulfato
SDS-PAGE	sódio dodecil sulfato gel de eletroforese em poliacrilamida
TSH	hormônio tireóideo estimulante
UF	ultrafiltração
UI	unidade(s) internacional(is)
zCG	gonadotrofina coriônica de zebras

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Características biológicas e moleculares da eCG	25
2.2	Atividade biológica da eCG.....	27
2.3	Metodos de purificação da eCG.....	29
2.4	Hipótese do trabalho	35
3	MATERIAL E MÉTODO	36
3.1	Local e Animais.....	36
3.2	Coleta do plasma.....	36
3.3	Preparação das amostras de plasma das éguas prenhes.....	37
3.4	Delineamento experimental	37
3.5	Diafiltração do pool de plasma com tampão Tris-HCl 0,1M, contendo NaCl 0,5M e NaN ₃ 0,2%, pH 7,4.....	38
3.6	Purificação do pool de plasma por cromatografia de afinidade em coluna de Blue-Sepharose FF.....	40
3.7	Purificação por cromatografia de afinidade em coluna de ConA-Sepharose 4B ..	41
3.8	Métodos analíticos	42
3.8.1	Determinação de concentração de proteína pelo método do BCA.....	42
3.8.2	Determinação de atividade biológica de eCG.....	43
3.8.3	Determinação da atividade específica, atividade total, fator de purificação e rendimento de purificação.....	44
3.8.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	44
3.8.5	Concentração das frações purificadas por Ultrafiltração.	45
3.9	Análise estatística.....	45

4	RESULTADOS	46
4.1	Diafiltração do pool de plasma com tampão Tris- HCl 0,1M, contendo NaCl 0,5M e NaN ₃ 0,2%, pH 7,4	46
4.2	Purificação do plasma por cromatografia de afinidade em coluna de Blue-Sepharose FF	47
4.3	Purificação por cromatografia de afinidade com ConA-Sepharose 4B	50
4.3.1	Cromatografia das frações purificadas que adsorveram a Blue Sepharose FF	50
4.3.2	Cromatografia das frações purificadas que não adsorveram à Blue Sepharose FF	53
4.3.3	Cromatografia do plasma diafiltrado.....	55
5	DISCUSSÃO	57
5.1	Diafiltração do pool de plasma com tampão Tris- HCl 0,1M, contendo NaCl 0,5M e NaN ₃ 0,2%, pH 7,4	57
5.2	Purificação do plasma por cromatografia de afinidade em coluna de Blue-Sepharose FF	57
5.3	Purificação por cromatografia de afinidade com ConA-Sepharose 4B	60
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICES	68

1 INTRODUÇÃO

Setenta anos atrás Cole e Hart (1930) descreveram que o soro de éguas prenhes estimulava o aumento do peso ovariano e o desenvolvimento sexual em ratas impúberes. A glicoproteína responsável por tal estímulo foi denominada PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrofin). Inicialmente, acreditava-se que este hormônio era produzido pela hipófise da égua prenhe. No entanto, com a evolução dos estudos imuno-histoquímicos, verificou-se que tal hormônio é sintetizado durante a gestação, após a migração das células trofoblásticas do concepto para o endométrio materno, que formam os cálices endometriais (MURPHY; MARTINUK, 1991; WOODING et al., 2001). Considerando a origem embrionária do PMSG e a semelhança de sua estrutura molecular com a gonadotrofina coriônica humana (hCG), tal hormônio glicoprotéico tem sido designado modernamente de eCG (eqüine Chorionic Gonadotrofin).

Nos eqüinos, a eCG é fundamental para a manutenção da prenhes, pois estimula a formação de corpos lúteos acessórios tornando adequada a síntese de progesterona, durante o período em que a placenta ainda não é capaz de sintetizá-la, em quantidade suficiente para manter a gestação (SUGINO et al., 1987). Em todas as espécies de mamíferos domésticos investigadas até o momento, a eCG promove dupla atividade biológica, exercendo ação semelhante ao hormônio luteinizante (LH) e ao hormônio folículo estimulante (FSH), ambos envolvidos na foliculogênese. A eCG é a única gonadotrofina capaz de se ligar tanto aos receptores de LH quanto de FSH (STEWART; ALLEN, 1981; MURPHY; MARTINUK, 1991; SOUMANO et al. 1996; SOUMANO; PRINCE, 1997). Considerando esta característica singular, a eCG tem sido amplamente empregada em programas de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), principalmente em fêmeas bovinas de corte (YAVAS; WALTON, 2000; BARUSELLI et al., 2008; ROSSA, 2008).

O Brasil possui atualmente o maior rebanho bovino comercial do mundo. A maior eficiência reprodutiva deste rebanho é fundamental para que se otimize a produção de carne e leite, e se abasteçam os mercados interno e externo. Por isso, diversos estudos têm sido conduzidos para investigar estratégias que proporcionem incrementos de eficiência reprodutiva. A administração de eCG é empregada

rotineiramente nos protocolos de IATF, além disso sua ação biológica proporciona aumento das taxas de prenhez em rebanhos com baixas taxas de ciclicidade, condição corporal comprometida e nas fêmeas recém-paridas (BARUSELLI et al., 2008). Apesar do alto custo da eCG, seu emprego têm oferecido vantajosa relação custo/benefício. Vale salientar que o alto custo da eCG no Brasil deve-se, em grande parte, pelo fato de sua produção e comercialização ser realizada por indústrias multinacionais estrangeiras dentre elas Intervet (Holanda) e Sintex (Argentina).

A partir da década de 40, o interesse pela molécula aumentou, e no mesmo período foram propostos os primeiros protocolos para extração de eCG do sangue de éguas prenhes. Estes protocolos utilizam o método de fracionamento por precipitação de proteínas, seguido de cromatografia. De modo geral, para aumentar a concentração da eCG na amostra, o fracionamento envolve a exposição do soro ou plasma da égua prenhe a diversas soluções, com diferentes solventes e pHs,. No entanto, a exposição da eCG a tais procedimentos causam modificações na conformação estrutural da molécula, conseqüentemente reduzindo sua atividade biológica. Gonzáles et al. (1998) propuseram um novo método para extração da eCG, que utiliza a diafiltração (DF), realizada em cartucho de hemodiálise, seguida por cromatografia de troca iônica.

A DF é uma técnica que se baseia na utilização de uma membrana de ultrafiltração com o objetivo de promover uma completa remoção, troca ou diminuição das concentrações de sais e solventes em soluções contendo proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos e outras biomoléculas. Este processo utiliza filtros com membranas permeáveis que permitem a separação dos componentes de uma solução, baseando-se no peso molecular dos diferentes constituintes. As moléculas maiores que os poros da membrana são retidas na membrana, enquanto as moléculas menores como sais, solventes e água, passam livremente pelos poros da membrana (BEATON; KLINKOWSKI, 1983).

Segundo Gonzáles et al. (1998) a associação da DF com a cromatografia de troca iônica permite a preparação da eCG, do plasma de égua prenhe de maneira que a atividade biológica de tal glicoproteína seja mantida de forma satisfatória. Os mesmos autores sugeriram que a cromatografia de afinidade em resina de Blue-Sepharose (GE- HEALTHCARE, 2005a) poderia reduzir a contaminação com eSA

A cromatografia por bioafinidade baseia-se no isolamento seletivo de macromoléculas biológicas, pelas propriedades bioquímicas específicas destas substâncias, como a afinidade de se unir reversivelmente a ligantes específicos. A albumina apresenta alta afinidade pela Blue-Sepharose e é separada dos outros componentes da solução pela sua capacidade de ligar-se covalentemente à matriz (COLLINS et al.,1995).

As lectinas são outra classe de ligantes para cromatografia de afinidade, às quais se ligam proteínas específicas, com certos tipos de resíduos de carboidratos (HAGE, 1999).

Segundo Hage (1999) umas das lectinas mais utilizadas para a purificação de conjugados glicoprotéicos é a Concanavalina A, desenvolvida a partir de um tipo de leguminosa (Concanavalina ensiformis - jack bean). A Concanavalina é a resina cromatográfica utilizada para estudos de caracterização estrutural do FSH e LH humano, da eCG e da Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) (DUFAU et al. 1972; MANJUNATH e SAIRAM, 1982; HAGE, 1999).

O objetivo deste estudo consiste em validar uma técnica que permita separar a eCG, contida no plasma de éguas prenhes, com 60 dias de prenhes, de forma que a quantidade recuperada seja satisfatória e a atividade biológica seja adequadamente preservada. Para isto serão comparadas diferentes técnicas cromatográficas de afinidade na separação da eCG após diafiltração ou não.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão abordará inicialmente os dados de literatura sobre a origem, características biológicas e moleculares da Gonadotrofina Coriônica Eqüina (eCG). Em seguida será demonstrada a importância da atividade biológica desta glicoproteína para as éguas e fêmeas de outras espécies domésticas. Serão apresentados estudos sobre os processos de extração e purificação da eCG a partir do plasma ou soro de éguas prenhes, assim como o ensaio biológico desenvolvido para mensurar a atividade biológica da eCG.

2.1. Características biológicas e moleculares da eCG

O conceito eqüino, entre 30 e 35 dias de gestação, desenvolve um segmento de células trofoblásticas que invade o endométrio do corno uterino gestante (ALLEN et al., 1973). Com 37 dias de gestação é evidenciada a migração das células trofoblásticas em direção ao estroma das células epiteliais uterinas. Nesta circunstância biológica, são formadas estruturas denominadas, cálices endometriais (WOODING et al., 2001). Neste período, tais estruturas iniciam a síntese e secreção de uma glicoproteína heterodimérica denominada de Gonadotrofina Coriônica Eqüina (eCG). Tal molécula integra a família dos hormônios glicoprotéicos, juntamente com o Hormônio Luteinizante (LH), Hormônio Folículo-estimulante (FSH) e Hormônio Tireóideo Estimulante (TSH) (LEGARDINIER et al., 2008). Por ser tratar de uma proteína produzida e secretada pelas células placentárias especializadas no útero de éguas prenhes, a eCG também integra a família das glicoproteínas gestacionais (SUGINO et al., 1987).

Os hormônios glicoprotéicos são heterodímeros constituídos por uma subunidade α , comum a todos os hormônios glicoprotéicos, ligada de forma não covalente a uma subunidade β , que é específica a cada um destes (LEGARDINIER et al., 2008). Assim sendo, é a subunidade β que determina as diferenças na especificidade e na atividade biológica, entre os diferentes hormônios glicoprotéicos

(PIERCE; PARSON, 1981). A subunidade α da hCG é comum à dos hormônios hipofisários humanos (LH e FSH), e em ovinos o mesmo foi observado em comparação com os hormônios tireoidiano (TSH - MURPHY; MARTINUK, 1991).

Estudos realizados com a eCG possibilitaram verificar que em eqüinos a subunidade β do eCG e do LH são idênticas e ambas codificadas por um único gene. Tal gene é expresso tanto na hipófise quanto nas células placentárias (MURPHY; MARTINUK 1991).

A estrutura não covalente mantida entre as subunidades α e β é rompida na presença de um pH ácido menor que 4 (PARSON et al., 1985). A estrutura glicoprotéica permanece estável, mantendo as duas subunidades unidas, em pH entre 4 e 8 (MURPHY; MARTINUK 1991).

Foram relatadas variações de 52 a 68,5kDa no peso molecular da eCG (MOORE; WARD, 1980). Moore e Ward (1980) verificaram que ambas as subunidades apresentam um peso molecular de aproximadamente 23kDa. Entretanto, Christakos e Bahl (1979) afirmam que a subunidade α apresenta peso molecular de 43kDa e a β 16,9kDa. Segundo estes autores a eCG pode apresentar diferentes graus de glicosilação e isso impossibilita um peso molecular fixo. Virmani et al. (2003) relatam que o peso molecular das subunidades α e β da eCG possui aproximadamente 40 e 20kDa, respectivamente. Estes autores compararam frações purificadas obtidas de método cromatográfico em gel filtração, a partir do soro eqüino, com padrão internacional de eCG, em gel de poliacrilamina SDS-Page, corado com "coomasie blue". Aleixo et al. (1995) observaram uma banda protéica, em gel de poliacrilamina SDS-Page, corado com nitrato de prata, de frações de plasma de éguas prenhes precipitado com ácido metafosfórico e etanol. Neste estudo, verificaram uma banda correspondente a subunidade α , ao redor de 43kDa, entretanto, nenhuma banda com 16,9kDa foi observada

A estrutura molecular da eCG é constituída por 45% de carboidratos. Os carboidratos integram as duas subunidades, entretanto, estão presentes em maior concentração na subunidade β (MOORE; WARD, 1980, LEGARDINIER et al. 2005). Destes carboidratos que constituem a molécula, aproximadamente 10% corresponde ao ácido siálico (CHISTAKOS; BAHL, 1979; MOORE; WARD, 1980). Murphy et al. (1991) relataram a importância do ácido siálico (ácido acetil neurâmico) na atividade biológica do eCG. Os mesmos autores verificaram que a remoção parcial dos

carboidratos na molécula de eCG determinou uma redução na atividade biológica da mesma, obtida em um extrato purificado.

Entre diferentes éguas gestantes e nos diferentes períodos de gestação de uma mesma égua, a concentração de carboidratos na molécula de eCG é variável. As moléculas de eCG contendo maiores quantidades de carboidratos apresentam maior atividade biológica (MURPHY; MARTINUK 1991). Estes mesmos autores relataram que a glicosilação da eCG é semelhante a do hCG, constituindo uma semelhança entre as moléculas também pela quantidade de carboidratos presentes.

Legardinier et al. (2005, 2008) relataram a inatividade biológica do eCG e LH eqüino, quando foram obtidos a partir do leite de ratas transgênicas. Esses autores referem que a atividade biológica da eCG é fortemente dependente da presença do complexo de ácido siálico na molécula.

2.2 Atividade biológica da eCG

Em eqüinos, a concentração basal de progesterona necessária para a manutenção da gestação torna-se garantida pela formação e manutenção de corpos lúteos acessórios. Tais estruturas surgem aproximadamente no 40° dia de gestação, período que coincide com o início da produção da eCG pelos cálices endometriais. A eCG promove a ovulação ou luteinização de folículos ovarianos entre o 17° e o 50° dias de gestação. Tal efeito biológico é determinado pela ligação da eCG aos receptores de LH. Verificou-se que os corpos lúteos acessórios persistem até o 180° dia de gestação. Após este período, as concentrações séricas de progesterona necessárias à manutenção da gestação são garantidas pela placenta.

Cole e Hart (1930) descreveram que em ratas impúberes a administração intraperitoneal de soro, obtido de éguas em diferentes períodos gestação, promovia o crescimento ovariano destes animais. Tal estímulo não foi observado quando o soro era proveniente de éguas com menos de 37 dias de prenhez. O estímulo máximo foi observado quando o soro era proveniente de éguas entre 43 e 80 dias de prenhez, e o estímulo mínimo após 210 dias de gestação. Allen (1969) e os autores Murphy e Martinuk (1991) descreveram que as concentrações séricas máximas de

eCG são observadas em torno do 60º dia de gestação, período em que se observa uma atividade biológica entre 60 e 80UI/mL. Para mensurar a atividade biológica de eCG do plasma ou soro de éguas prenhes, os mesmos autores realizaram o bioensaio proposto por Cole e Erway (1941).

Cole e Erway (1941) administram quantidades pré-determinadas de um padrão comercial de eCG. Foram injetadas (via intraperitoneal) em 25 ratas impúberes, quantidades crescentes de eCG em unidades internacionais por µg de proteína total/mL sendo 4, 6, 8, 12 e 20UI. As ratas foram divididas equitativamente por peso corporal em cinco grupos experimentais com 5 ratas cada. Após 48 horas os animais foram sacrificados e os ovários dissecados e pesados. O peso dos ovários foi ajustado para o peso vivo dos animais. Tal medida possibilitou a determinação de uma equação linear obtida entre as UI de eCG e peso dos ovários. Ao medir o peso ovariano das ratas bioestimuladas com plasma ou soro de éguas prenhes, os autores obtiveram resultados de atividade biológica em Unidades Internacionais de eCG por mililitro de solução previamente aplicada nas ratas (UI/mL).

Outros autores relataram alta atividade biológica em éguas com prenhes ao redor de 60º dia. Ayres et al. (2007) e Gené et al. (2007) mensuraram a atividade biológica em um pool formado com o plasma de 4 éguas, com 60 dias de prenhez em média, e observaram uma atividade biológica de aproximadamente 158,4UI/mL. Gonzales et al. (1998) encontraram uma atividade biológica de 52UI/mL no plasma de éguas prenhes entre 45 a 100 dias de gestação. Aleixo et al. (1995) verificaram atividades de 72, 93, 89 e 65UI/mL, em 4 éguas com 58, 65, 72 e 85 dias de gestação, respectivamente. Virmani et al. (2003) obtiveram atividade biológica de 97UI/mL do soro de diferentes pôneis fêmeas de 60 a 110 dias de gestação.

Nos mamíferos, a eCG demonstra atividade luteinizante e folículo estimulante, característica biológica que a torna um potente agente de indução da foliculogênese nos animais domésticos e em outros mamíferos (STEWART; ALLEN, 1981; MURPHY; MARTINUK, 1991; SOUMANO et al. 1996). Tal característica o torna um hormônio promissor em protocolos que objetivam a sincronização de estros de fêmeas bovinas (MADUREIRA et al., 2004; BARUSELLI et al., 2008; ROSSA, 2008). Em vários estudos a eCG demonstrou aumentar a fertilidade de fêmeas com condição corporal aquém da desejada (BARUSELLI et al., 2008).

2.3 Métodos de purificação da eCG

Os principais métodos de preparo e purificação do plasma de éguas prenhes são pouco relatados pela literatura. A maioria dos estudos descreve a segregação do eCG a partir do plasma ou soro de éguas prenhes pela exposição do mesmo, a condições extremas de pH, baixas temperaturas e pela presença de diferentes solventes. A utilização de métodos cromatográficos com resinas de troca iônica promove de maneira geral uma perda de 40% na atividade biológica, comparada a quantidade inicialmente mensurada no plasma.

Em 1903, o botânico russo Mikhail Tswett descreveu a separação de pigmentos vegetais contidos em uma solução, pelo uso de adsorventes sólidos. Tal processo foi designado “Cromatografia”, nomenclatura proveniente do grego *chroma*/cor e *graphein*/escrever (VOET; VOET, 1990).

Atualmente, conceitua-se a cromatografia como um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura. A separação é realizada pela distribuição destes componentes entre duas fases, uma fase móvel e outra estacionária. Os diferentes componentes que constituem a fase móvel são retidos de forma particular pela fase estacionária. A diferença no padrão de migração das diferentes moléculas de uma mistura pela fase estacionária favorece a separação das moléculas contidas em uma mistura.

A classificação dos diferentes métodos de cromatografia refere-se, em geral, ao mecanismo de separação. Desta forma, na cromatografia de filtração em gel, a separação das moléculas ocorre pelas diferenças no peso molecular. As pequenas moléculas, contidas na fase móvel, penetram nos poros da resina que compõe a fase estacionária, favorecendo uma emergência mais lenta das moléculas de menor peso molecular. As moléculas de maior peso molecular percorrem livremente as microesferas, passando com maior velocidade pela matriz que constitui a fase estacionária.

Na cromatografia de adsorção, moléculas específicas da mistura ligam-se à fase estacionária por forças eletrostáticas, forças de Van der Waals ou ligações de hidrogênio. Assim, ao percorrer a matriz estacionária as moléculas a serem

segregadas se ligam de maneira específica à matriz, enquanto os demais componentes da mistura percorrem a matriz sem serem retidos. Após esta etapa, é utilizada uma solução de eluição específica, que rompe as ligações entre proteína a ser segregada e a matriz. A solução de eluição deve ser capaz de romper tais ligações, por competição ou por alterarem a molécula ligada.

A cromatografia de troca iônica é bastante semelhante à cromatografia de adsorção. No entanto, as ligações que se estabelecem entre moléculas específicas da mistura e a fase estacionária são do tipo iônica. A cromatografia de afinidade promove o isolamento seletivo de macromoléculas biológicas, aproveitando-se das propriedades bioquímicas que determinadas substâncias possuem de ligarem-se reversivelmente a ligantes específicos os quais, por sua vez, constituem a matriz estacionária (COLLINS et al., 1995).

Diversas técnicas cromatográficas foram empregadas na extração e purificação da eCG. A primeira técnica de extração do eCG foi desenvolvida por Goos e Cole (1940). Os autores obtiveram um extrato bruto, parcialmente livre das proteínas séricas (albumina, bilirrubina - "contaminantes" da amostra a qual purificasse a eCG), precipitando o soro de éguas prenhes com acetona a 4°C. Uma variante deste método foi descrita por Gospodarowicz e Papkoff (1967) e Aggarwal et al. (1980), que utilizaram uma solução de etanol -20°C para solubilizar a eCG e precipitar esta solução com ácido metafosfórico.

Gospodarowicz e Papkoff (1967) realizaram o fracionamento a partir do soro de égua prenhe por redução do pH. Para tanto utilizaram solução de ácido metafosfórico e reduziram o pH a 3. O pH da solução foi ajustado com adição de hidróxido de sódio até pH 4,5. Em seguida, foi realizada a centrifugação e posterior precipitação por etanol -20°C. A amostra concentrada foi submetida à cromatografia de gel filtração em coluna de Sephadex G-100 e à cromatografia de troca iônica em coluna de Sulfoetil-Sephadex C-50. Após o processo de separação por gel filtração, os autores encontraram 25mg/L de proteína total, com uma atividade biológica específica média de 2750UI/mg. No segundo passo, após o procedimento de cromatografia de troca iônica, houve um rendimento de proteína total de 5mg/L com uma atividade específica de 15800UI/mg. De fato, tal procedimento segregou a eCG das proteínas totais, promovendo um aumento da atividade biológica da eCG por mg

de proteína total recuperada. O rendimento da quantidade de proteína foi obtido por ultracentrifugação. A mesma técnica foi utilizada para purificar a eCG contida em preparações comerciais. A atividade biológica anterior ao fracionamento foi de 2000UI/mg de proteína da amostra purificada, depois da purificação a atividade medida foi de 8000-9000UI/mg (GOSPODAROWICZ, 1972). Em 1980, esta mesma técnica foi utilizada na extração e purificação de eCG do soro de éguas prenhes e de meios de cultura de células trofoblásticas. O método permitiu a recuperação de 56% da atividade biológica dos extratos não fracionados (AGGARWAL et al., 1980).

Virmani et al. (2003) aplicaram a coluna de gel filtração (Sephadex G-100) uma amostra de soro processado, como descrito por Gospodarowicz e Papkoff (1967), contendo 1350UI/mg e obtiveram dois picos protéicos. O pico que apresentou atividade biológica (2400UI/mg) foi liofilizado e aplicado à resina de troca iônica (Sulfoetil-Sephadex C-50). A atividade específica após a eluição foi de 13500UI/mg.

A atividade biológica medida pelos autores descritos acima, foi realizada pelo ensaio biológico descrito por Cole e Erway (1941).

Nos protocolos descritos acima foram utilizadas, no processo de extração, grandes quantidades de solventes à baixa temperatura, centrifugações e exposição do extrato a variações extremas de pH. Esses protocolos de fracionamento baseiam-se nas diferenças de solubilidade das diversas proteínas contidas na amostra, em diferentes soluções. Com a adoção de tais procedimentos, a proteína de interesse (eCG), fica submetida a condições extremas de desnaturação, condições que favorecem a perda de sua atividade biológica (GONZALES et al., 1998).

Considerando as perdas de atividade biológica causadas pelas condições extremas de pH e pela exposição a diferentes solventes, Gonzales et al. (1998) propuseram um método alternativo na preparação da eCG, a partir do soro ou plasma. O protocolo proposto utiliza a diafiltração (DF) em cartucho de hemodiálise, para concentrar a amostra antes de submetê-las à adsorção direta em resina de troca iônica, substituindo os procedimentos tradicionais de fracionamento.

A diafiltração (DF) é um procedimento utilizado na hemodiálise de rotina nos centros médicos, como alternativa de tratamento para pacientes com insuficiência renal crônica. O procedimento de DF na hemodiálise ocorre com emprego de um

dialisador. Tal dialisador possui membranas de ultrafiltração com capacidade de filtrar grandes volumes de sangue. Pelo emprego desta técnica, removem-se do sangue moléculas de baixo peso molecular, como uréia e creatinina, procedimento que possibilita a concentração das proteínas plasmáticas de alto peso molecular, dentre estas a albumina, que pesa aproximadamente 66kDa (SHETTIGAR; REUL, 1982; LITTORIN et al., 1984).

No procedimento proposto por Gonzales et al. (1998), o plasma é submetido a uma condição constante de pH, e é mantido a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C), não requerendo a adição de solventes e ainda tendo como vantagem possibilitar o processamento do plasma em quantidades superiores às laboratoriais.

Gonzales et al. (1998) promoveram a precipitação de 10L de plasma de éguas prenhes, com 45 a 100 dias de gestação, e obtiveram uma atividade biológica de 52UI/mL de plasma. Tal precipitação foi promovida pela adição de ácido acético com o objetivo de reduzir o pH a 4,0. O sobrenadante foi DF com solução tampão de acetato de sódio 100mM, pH 4,0, utilizando cartucho para hemodiálise com membrana de fibra de polisufona, área filtrante de 1,8 m² e 5kDa de corte de peso molecular. O diafiltrado foi incubado em 300g de DEAE-Sephacel, previamente equilibrada com acetato de sódio 100mM, pH 4,0, por um período de 1,5h. Após este período de incubação a resina foi empacotada e lavada com mesmo tampão utilizado para a incubação. As proteínas que se ligaram à resina foram eluídas com tampão de 100mM acetato de sódio e NaCl 0,3M, pH 4,5. Nesta etapa cromatográfica os autores obtiveram uma atividade biológica específica de 414UI/mg. A atividade biológica foi medida pelo ensaio de Cole e Erway (1941).

Após esta etapa cromatográfica, os autores submeteram a fração purificada com 414UI/mg à cromatografia por troca iônica com resina S-Sepharose. Para esta etapa, os autores empacotaram a resina em uma coluna de 2,5 x 4,3cm, equilibrada com acetato de sódio 50mM, pH 4,5. As proteínas que adsorveram à resina foram eluídas utilizando tampão de acetato de amônio 200mM com NaCl 0,5M, pH 8,5. Primeiramente os autores lavaram a coluna com uma mistura de 25% do tampão de eluição e 75% do tampão de equilíbrio, seguido de lavagem com 100% do tampão eluição. Foi verificada atividade de 3960UI/mg no pico eluído após a passagem dos

100% do tampão de eluição. A atividade biológica foi medida pelo ensaio de Cole e Erway (1941) e a concentração protéica foi calculada pelo método do BCA[®] (Pierce).

Gonzales et al. (1998) obtiveram um rendimento de purificação de 1,5 vezes maior que no primeiro passo do método de purificação de eCG, desenvolvido por Gospodarowicz e Papkoff (1967).

Gonzales et al. (1998) relataram o uso da resina Blue-Sepharose em experimentos com a albumina do plasma de éguas prenhes. A cromatografia em Blue-Sepharose é específica para o fracionamento de albumina, interferon, alguns fatores de coagulação e algumas enzimas (NAD e NADP). Segundo o fabricante da resina (GE-HEALTHCARE, 2005a), o ligante dessas moléculas é o Cibacron Blue F3G-A, um corante covalentemente ligado à agarose (resina de filtração em gel, originalmente). Tal corante, na presença do tampão de ligação, adsorve a albumina por forças eletrostáticas e/ou hidrofóbicas, que são posteriormente rompidas quando a resina é submetida ao tampão de eluição. McFarlane et al. (1991) relataram o uso da Blue-Sepharose, para purificação da gonadotrofina coriônica de zebras e de jumentas.

A resina para cromatografia de afinidade ConA-Sepharose 4B é normalmente utilizada para separar e purificar glicoproteínas, polissacarídeos e glicopeptídios (DUFAU et al. 1972; HAGE, 1999). ConA-Sepharose 4B contém Concanavalina A que é uma proteína tetrâmera isolada da Concanavalina ensiformis (Jack bean - BESSLER et al., 1974; GE-HEALTHCARE, 2005b).

Manjunath e Sairam (1982) utilizaram a ConA Sepharose 4B para a purificação de extrato comercial e caracterização estrutural do hCG. Os autores obtiveram frações purificadas de hCG após aplicação de extrato comercial em coluna 1,5 x 22cm, empacotada a ConA Sepharose e equilibrada com tampão Tris-HCl 20mM, com MgCl₂ 10mM, CaCl₂ 10mM, NaCl 0,5M e NaN₃ 0,02%, pH 7,4. A fração contendo hCG foi eluída utilizando-se 300mM de α -metilglucosídeo. Todo o procedimento foi realizado a 4°C.

Em outros dois estudos de extração e purificação da eCG, Ayres et al. (2007) e Gené et al. (2007) utilizaram o método de DF associado a cromatografia de afinidade seguida de uma gel filtração. Em ambos os estudos os pesquisadores usaram para o processo de DF cartucho de hemodiálise com membrana de diacetato de celulose

(Dialisador DICEA - Baxter Healthcare Corporation - EUA) com área filtrante de 2,1m² e corte de 5kDa de peso molecular.

Ayres et al. (2007) utilizaram a resina Blue Sepharose FF (GE) para a cromatografia de afinidade. Os autores diafiltraram um “pool” de plasma obtido de 3 éguas prenhes, com 60 dias de gestação em média, utilizando como lavado do dialisado KH₂PO₄ 50mM, pH 7,0, solução tampão de ligação específica para a resina. A amostra diafiltrada foi submetida à cromatografia de afinidade (HiTrap Blue Sepharose FF 5mL, GE) e posteriormente foi eluída com KH₂PO₄ 50mM com NaCl 0,5M, pH 7,0. As frações que não se ligaram à resina foram liofilizadas e filtradas em coluna de Sephadex G-100.

Após a cromatografia de afinidade, os autores encontraram atividade biológica média de 9,5UI/mg (15,53UI/mL) em uma concentração de proteína total de 23,8mg/mL. Na segunda etapa, compreendida pela cromatografia de gel filtração, a atividade biológica foi de 11,2UI/mg (35,48UI/mL) em uma concentração proteica total de 10,7mg/mL. A atividade biológica foi medida pelo ensaio de Cole e Erway (1941). A concentração de proteína de cada amostra coletada nas diferentes cromatografias foi realizada pelo método do BCA[®] (Pierce).

Gené et al. (2007) utilizaram a ConA como resina de afinidade seguida de gel filtração (Sephadex G-100). A DF foi realizada com um “pool” de plasma obtido de éguas prenhes, com 60 dias de gestação em média, utilizando como lavado do dialisado 20mM de Tris-HCl (pH 7,4), contendo 0,5M NaCl e 0,02% NaN₃ (tampão de ligação da resina ConA-Sepharose 4B). Utilizou-se um tampão de eluição com 300mM de α-metilglucosídeo (açúcar utilizado para eluir glicoproteínas adsorvidas a ConA). As frações que se ligaram à coluna de ConA foram liofilizadas e aplicadas à gel filtração. Os autores observaram uma atividade biológica de 9,5UI/mg (2,5mg/mL) e 26,2UI/mg (0,6mg/mL) respectivamente. A atividade biológica foi medida pelo ensaio de Cole e Erway (1941). A concentração de proteína de cada amostra coletada nas diferentes cromatografias foi mensurada pelo método do BCA[®] (Pierce).

O uso da Blue-Sepharose e da ConA Sepharose 4B para purificação de gonadotrofina de outras espécies de eqüídeos foi relatado por McFarlane et al.

(1991). Os autores relatam o uso da Blue-Sepharose e da ConA Sepharose 4B para purificação de gonadotrofina coriônica de zebras (zCG) e de jumentas (dCG).

As purificações da zCG e da dCG foram realizada com soro de zebra e jumentas prenhes, respectivamente, aplicado-se o plasma em coluna cromatográfica contendo 70mL de Blue-Sepharose equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05M, com NaCl 0,5M e NaN_3 0,01%, pH 8,0. O tampão de eluição utilizado foi o mesmo do equilíbrio, adicionado de NaSCN (0,5M). A fração eluída foi dialisada e liofilizada. A amostra liofilizada foi dissolvida em tampão Tris-HCl 20mM, com NaCl 15M, CaCl_2 1mM, pH 7,4 e aplicada em uma coluna de 20mL de Concanavalina A Sepharose, equilibrada com mesmo tampão. Para eluição, utilizou-se o mesmo tampão utilizado por Gené et al. (2007), entretanto, a uma concentração de 200mM do açúcar (α -metilglucosídeo) para eluição. A fração eluída da coluna foi liofilizada e aplicada em uma coluna com resina Sulfopropil Sepharose C50. Posteriormente, a fração eluída foi testada quanto atividade biológica e quantificada em radioimunoensaio para eCG. A atividade biológica de eCG foi quantificada em cultura de célula de Leydig de ratos para mensuração de LH, modificada, descrita por Ramachandran e Sairam (1975).

McFarlane et al. (1991) encontraram atividade biológica de 0,3% em relação a um padrão internacional de eCG para a cultura de células e de 1,6% no radioimuniensaio de eCG.

2.4 Hipótese do trabalho

A purificação do plasma de éguas prenhes, pelo uso da cromatografia de afinidade com Blue Sepharose, seguida à cromatografia de afinidade com Concanavalina A, constitui um eficiente protocolo de purificação para a obtenção de uma fração purificada e com elevada atividade biológica de eCG.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Local e Animais

Foram selecionadas 4 éguas, prenhes, sem raça definida do Campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo. As éguas foram cobertas por diferentes garanhões e a confirmação da gestação foi feita, por ultra-sonografia, ao redor dos 13 dias após a cobertura e confirmada ao redor do 60º dia de gestação. Não foi realizado nenhum teste de dosagem de eCG antes da retirada do plasma das éguas. As éguas tinham em média 69 dias de gestação no dia da retirada do sangue.

A etapa de purificação foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento de Processos do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan

3.2 Coleta do plasma

Foram coletados oito litros de sangue de cada égua prenhe, em bolsas específicas para a coleta de sangue e separação do plasma para eqüinos (JR Veterinária LTDA), com 400 mL de solução anticoagulante ACD (1,47g de dextrose, 4,8g de citrato de sódio, 1,47g de ácido cítrico, para cada 100mL de solução). Neste procedimento foram respeitadas condições de assepsia, para minimizar os riscos de contaminação da amostra e de infecção da égua. Para tanto, foi realizada tricotomia da região média da veia jugular esquerda das 4 éguas, lavagem da região com água e sabão, e desinfecção com álcool iodado. Um botão anestésico sub-cutâneo (1mL de Lidocaína 2%) foi feito para reduzir a sensibilidade local durante o procedimento de coleta. A agulha, acoplada à bolsa de coleta, foi inserida na veia jugular dos animais e o sangue coletado nas bolsas. Foram realizados movimentos de vai e vem para a mistura do sangue com o anticoagulante. Após a coleta, as bolsas contendo sangue foram armazenadas à 4°C, por 24 horas, para decantação das hemácias.

Após este período, o plasma foi separado das hemácias (aproximadamente 5L de plasma de cada égua prenhe), por sucção feita com bomba peristáltica (Watson-Marlon) e armazenados em quatro galões plásticos de 5L, identificados (um para cada égua), estocados à 4°C, por no máximo 8 horas, até o início da etapa de diafiltração e concentração.

3.3 Preparação das amostras de plasma das éguas prenhes

Para se obter uma amostra mais representativa foi feito um pool de 4L de plasma formado a partir de 1L de plasma de cada égua. Este procedimento foi realizado um dia após a obtenção do sangue das éguas. Deste pool, 1L foi submetido a diafiltração e concentração para posterior utilização nas purificações cromatográficas, 500 mL foram congelados em falcons de 50mL para serem utilizados diretamente nas cromatografias e 15mL foram aliqüotados em microtubos de 1,5mL para análise do plasma. Após estes procedimentos os plasmas foram congelados à temperatura de -56°C.

3.4 Delineamento experimental

Após a obtenção do pool de plasma o delineamento experimental foi realizado seguindo o fluxograma da Figura 1. Foram testadas 2 estratégias. A primeira estratégia consistiu em aplicar o plasma à coluna de Blue Sepharose FF (BS) (GE HEALTHCARE). Cada uma das amostras coletadas foi novamente purificada em coluna de Concanavalina A Sepharose-4b (ConA) (GE HEALTHCARE). Na segunda estratégia, o plasma foi diafiltrado e concentrado e depois purificado em ConA. Cada etapa destas estratégias será descrita detalhadamente a seguir.

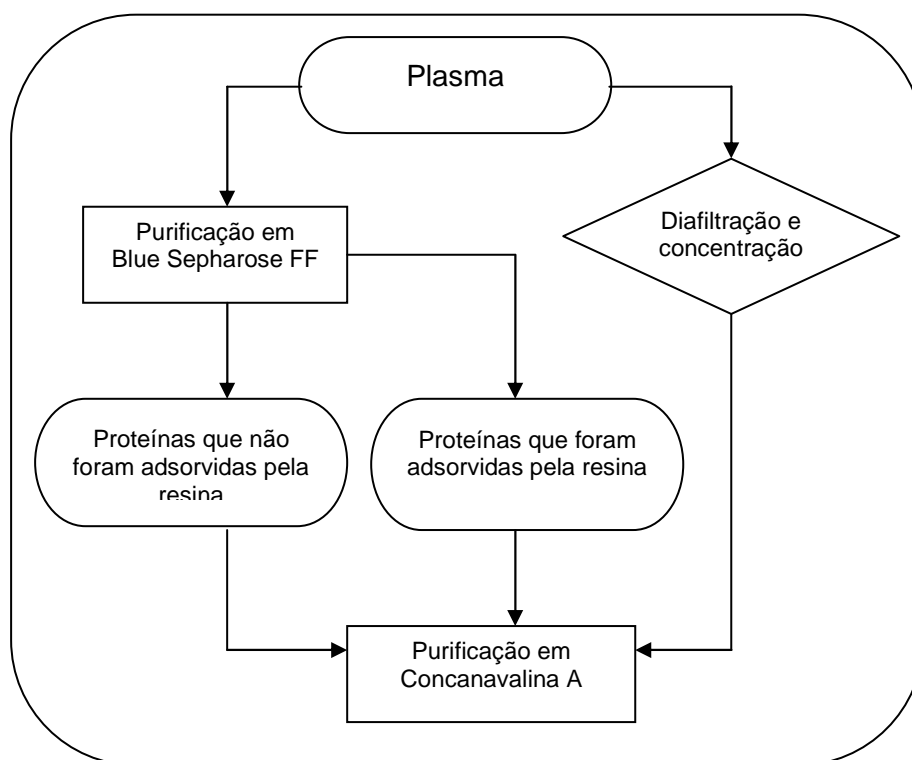


Figura 1 - Fluxograma de purificação de eCG empregando resina de Blue Sepharose FF e ConA ou somente ConA.

3.5 Diafiltração do pool de plasma com tampão Tris-HCl 0,1M, contendo NaCl 0,5M e NaN_3 0,2%, pH 7,4.

O processo de diafiltração (DF) foi realizado em um cartucho de hemodiálise, que consiste de uma membrana de diacetato de celulose, com área de $2,1\text{m}^2$ e corte de 5 kDa (Baxter Hospitalar LDTA).

A passagem do plasma pelo dialisador foi feita por um sistema de recirculação, com emprego de bomba peristáltica (Watson-Marlon), no qual o retentado retorna à proveta de 1L que contém o plasma. Para promover a DF, o tampão de interesse foi introduzido, por gravidade, em fluxo contínuo, pela parte externa da membrana do dialisador (Figura 2). O permeado foi descartado.

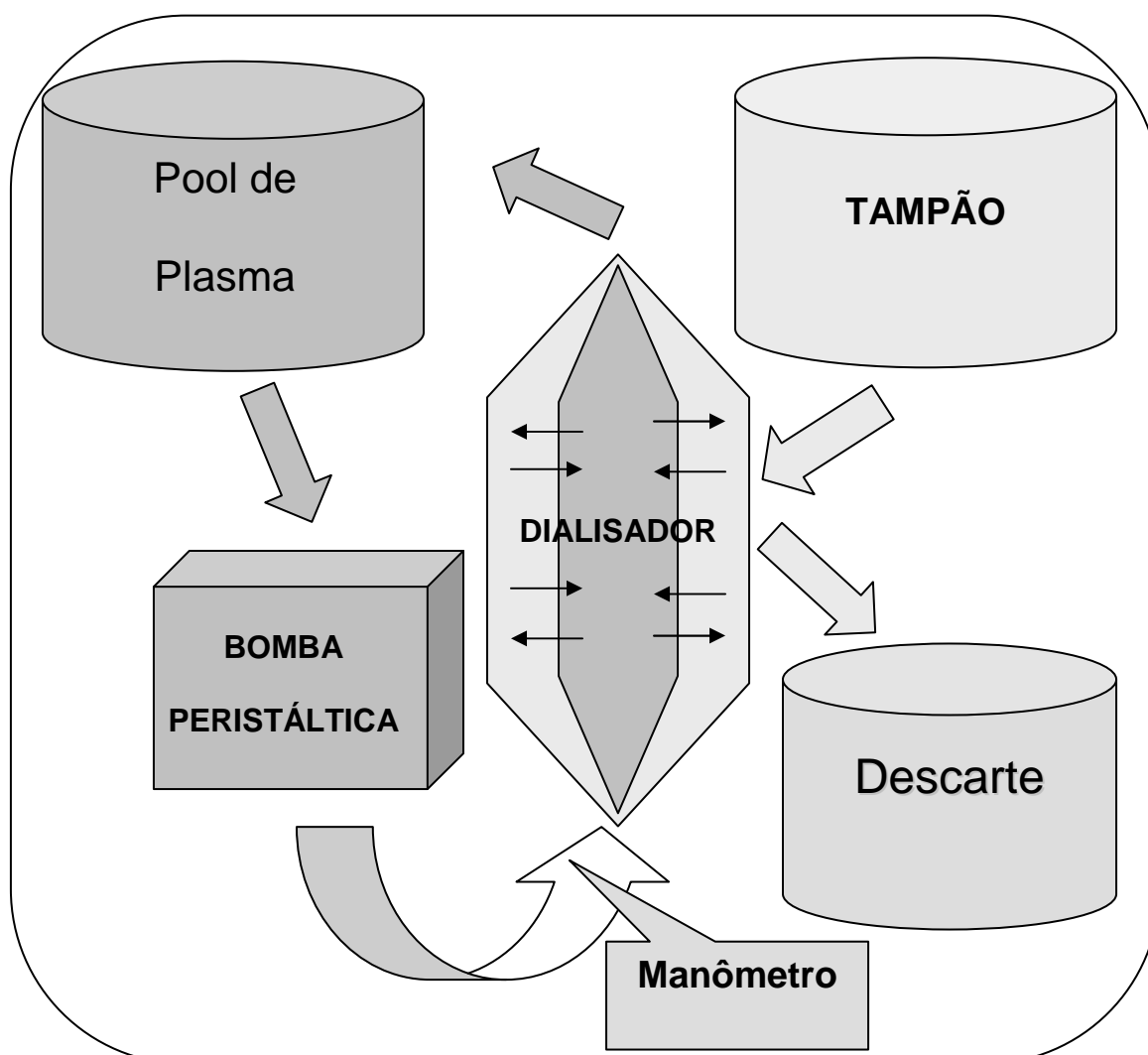


Figura 2 - Esquema de Recirculação para o processo de DF.

No mesmo dia da formação do pool de plasma foi realizada a DF. Do pool de 4 litros, foi separado 1L para diafiltração do plasma, na qual foram usados 3 litros de tampão Tris-HCl 0,1M, contendo NaCl 0,5M e NaN_3 0,2%, pH 7,4. O plasma foi colocado em uma proveta de 1L que foi acoplada ao sistema de DF. A pressão do sistema foi mantida entre 80 e 110 mmHg e o processo foi realizado por um período de aproximadamente 1h.

Cinco amostras de 50mL e dez amostras de 1,5mL do plasma dialisado foram identificadas e congeladas à temperatura de -56°C . As amostras de 50mL foram utilizadas na cromatografia com a resina ConA. As amostras de 1,5mL foram coletadas para determinação de concentração de proteína e de atividade biológica, e eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.6 Purificação do pool de plasma por cromatografia de afinidade em coluna de Blue-Sepharose FF

Cinquenta mililitros da resina Blue-Sepharose FF (BS) foram empacotados em uma coluna XK 26/20 (GE Healthcare) com tampão fosfato 100mM contendo NaCl 1,0M, pH 7,4 com fluxo de 13,0mL/min, utilizando-se o sistema cromatográfico FPLC AKTÄ Explorer (GE HEALTHCARE).

A purificação da amostra de plasma na coluna de BS foi feita em duas corridas consecutivas. Para isto, uma amostra de 50mL do pool de plasma foi descongelada em água corrente. A coluna de BS foi equilibrada com 250mL do tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,4 com fluxo de 8,0mL/min. Os picos de absorbância, registrados em 280nm (detector UV do sistema cromatográfico), foram coletados em tubos plásticos de 50mL. As frações coletadas foram identificadas.

Inicialmente, 20mL de pool de plasma foram aplicados à coluna de BS, pelo sistema cromatográfico. Durante a entrada de amostra, foram coletadas frações de 50mL contendo as proteínas que não foram adsorvidas na coluna (“flow through”). Em seguida a coluna foi reequilibrada com 100mL do tampão de equilíbrio. Após o reequilíbrio as proteínas que se ligaram à resina foram eluídas com tampão Tris-HCl 20mM contendo NaCl 0,5M, pH 7,4 .

Para a segunda corrida a coluna foi equilibrada com o tampão Tris-HCl 20mM. pH 7,4 com fluxo de 8,0 mL/min e 20 mL de pool de plasma aplicados foram aplicados. Esta corrida foi realizada nas mesmas condições que a primeira, tendo sido coletadas também frações de 50 mL do “flow through” e do pico eluído com o tampão de equilíbrio contendo NaCl 0,5M .

Imediatamente após a coleta de cada fração, cinco amostras de 1,5 mL de cada fração foram coletadas em tubos plásticos e congeladas à -56°C, para a determinação da concentração de proteína, de atividade biológica e eletroforese em gel de poliacrilamida.

Uma segunda etapa de purificação foi realizada utilizando-se coluna de Concanavalina A (ConA) (GE HEALTHCARE). Foram analisadas as frações das proteínas que foram adsorvidas e das proteínas que não foram adsorvidas na coluna de BS. Para a análise das proteínas não adsorvidas na coluna de BS, os “flow

throughs” das duas corridas foram reunidos e aplicados à coluna de ConA. Para a análise das proteínas que eluíram da coluna de BS com NaCl 0,5M em tampão Tris-HCl as correspondentes frações das duas corridas também foram reunidas para posterior purificação deste pool em coluna de ConA.

Depois das duas corridas a coluna BS foi lavada com 500mL de NaOH 0,1M, seguido de 200mL de etanol 70% e estocada com tampão acetato 0,1M pH 8,0 contendo 20% de etanol,.

3.7 Purificação por cromatografia de afinidade em coluna de ConA-Sepharose 4B

Cinquenta mililitros da resina Concanavalina A - Sepharose 4B (ConA) (GE HEALTHCARE) foram empacotadas em uma coluna XK 26/20 (GE HEALTHCARE) com tampão Tris-HCl 20mM contendo NaCl 0,5M, pH 7,4 com fluxo de 6,6mL/min, utilizando-se o sistema cromatográfico FPLC AKTÄ Explorer (GE HEALTHCARE). Foram utilizados 250mL de tampão para empacotamento.

Foram testadas 3 diferentes amostras para purificação em resina de ConA: 1 - a fração que corresponde ao pico eluído da coluna de BS com tampão Tris-HCl contendo NaCl 0,5M; 2 - a fração “flow through” da coluna de BS e 3 - o plasma dialisado.

A amostra 2 foi aplicadas na ConA imediatamente após a purificação na BS. À amostra 2, foi adicionado NaCl sólido até chegar a concentração de 0,5M antes da aplicação na coluna de ConA. A amostra 1 foi aplicadas na ConA 19 dias após a purificação na BS.

A coluna foi equilibrada com 250mL do tampão Tris-HCl 20mM contendo NaCl 0,5M, pH 7,4 com fluxo de 4,5mL/min.

Após a aplicação da amostra a coluna foi reequilibrada com 100mL do tampão Tris-HCl 20mM contendo NaCl 0,5M, pH 7,4 em mesmo fluxo. As proteínas adsorvidas na coluna foram eluídas com o tampão de equilíbrio contendo 20mM, 100mM e 300mM de α -metilglucosídeo,

Os picos de absorbância, registrados em 280nm, foram coletados em tubos plásticos de 50mL.

Imediatamente após a coleta de cada fração, cinco amostras de 1,5mL de cada fração foram coletadas em tubos plásticos identificados e congeladas à -56°C, para a determinação da concentração de proteína, de atividade biológica, e eletroforese em gel de poliacrilamida.

Depois do término da cromatografia, a coluna ConA foi lavada com 600mL de tampão borato 0,1M contendo 0,1% de detergente aniônico, pH 6,5, seguido de 900mL de tampão Tris-HCl 20mM contendo NaCl 0,5M. pH 7,4, e estocada com tampão de acetato de sódio 0,1M contendo NaCl 1,0M, CaCl₂ 1mM, MnCl₂ 1mM e MgCl 1mM, pH 6,0.

3.8 Métodos analíticos

Todas as amostras recolhidas (mantidas à -56°C) foram analisadas através dos seguintes testes:

- determinação da concentração de proteína pelo método de BCA
- determinação da atividade biológica
- análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida

3.8.1 Determinação de concentração de proteína pelo método do BCA

A determinação de concentração de proteína de cada amostra coletada nas diferentes cromatografias foi realizada pelo método do BCA[®] (Pierce). Trata-se de um método colorimétrico, realizado em microplacas, que está fundamentado na quantidade de íons cobre do reagente que sofrem redução, por ação das proteínas da amostra.

Primeiramente, foi realizada a diluição de um padrão de globulina (fornecido juntamente com o kit para quantificação), que foi submetido à mesma reação que as amostras, e que foi utilizado para se obter a curva de calibração (de quantidade de

proteína, em $\mu\text{g/ml}$, pela absorbância lida). Todas as amostras (pontos da curva padrão e amostras provenientes do processo) foram analisadas em duplicatas.

Como o intervalo ótimo de leitura do kit está entre 2 e $40\mu\text{g/ml}$, as amostras foram diluídas, de modo que a leitura fosse feita nesse intervalo.

3.8.2 Determinação de atividade biológica de eCG

A determinação da atividade biológica de eCG das amostras foi realizada utilizando ratas *Wistar* impúberes (*Ratus Novergicus*).

Para a construção da curva de calibração de eCG foram utilizadas 25 ratas, estratificadas eqüitativamente pelo peso vivo em cinco grupos ($n=5$, cada). Os animais de cada grupo receberam uma única injeção, intra-peritoneal, de padrão internacional de eCG (NIBSC- National Institute for Biological Standards and Control, Reino Unido) em concentrações crescentes: 4, 6, 8, 12 e 20UI. Para isso o conteúdo liofilizado de uma ampola de padrão internacional, contendo 1.600UI, foi diluído em 40 mL de solução fisiológica. Obtendo-se assim 40UI/mL. Para os grupos de ratas que receberam 4UI, 6UI, 8UI, 12 UI e 20 UI do padrão internacional de eCG, foram aplicados volumes de 0,1; 0,15; 0,2; 0,3 e 0,5mL respectivamente, via intraperitoneal. Quarenta e oito horas após a administração das doses, os animais foram sacrificados e foi promovida a biopsia dos ovários. Os ovários foram pesados. O peso do ovário de cada rata foi dividido pelo seu próprio peso vivo, resultando uma curva crescente da relação peso do ovário/peso vivo com as doses crescentes do padrão.

Após a determinação da curva de calibração, 1mL de cada amostra proveniente das purificações, previamente selecionadas, foi administrada em 5 ratas e o peso dos ovários foi medido. Com os valores da relação peso ovário/peso vivo obtidos, foi realizada a comparação do resultado com a curva de calibração, obtendo-se a concentração de eCG em Unidades Internacionais (UI) por mililitro (mL) da amostra.

3.8.3 Determinação da atividade específica, atividade total, fator de purificação e rendimento de purificação

Com os resultados da atividade biológica, associados aos resultados de concentração protéica e volume das frações recolhidas nas cromatografias, foi realizado o cálculo de atividade específica, atividade total, fator de purificação e rendimento de purificação.

A atividade específica foi obtida dividindo-se a atividade biológica de eCG (UI/mL) pela concentração protéica (mg/mL) dos extratos, para cada fração analisada.

A atividade total de cada extrato foi obtida multiplicando-se a atividade biológica de eCG (UI/mL) pelo volume total das frações..

O fator de purificação foi obtido dividindo-se a atividade específica das amostras após a purificação pela atividade específica antes da purificação.

O rendimento de purificação foi calculado dividindo-se a atividade total das frações purificadas, pelo total da atividade biológica das amostras antes da purificação.

3.8.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os géis de eletroforese em poliacrilamida foram preparados, utilizando-se solução estoque de acrilamida 30% [acrilamida 11% (p/v), N,N'-metilenobisacrilamida 1% (p/v)], tampão do gel de empilhamento [Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,1% (p/v)] ou tampão do gel de separação [Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,1% (p/v)], persulfato de amônio 10% (p/v) e TEMED. Os géis de empilhamento foram feitos com espessura de 1,0 mm. As corridas foram realizadas em tampão de eletroforese [Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1% (p/v)], sob voltagem de 120 V, à temperatura ambiente. Os géis foram corados utilizando-se corante de Coomassie Blue (ácido acético glacial 10%, etanol 45%, azul de Coomassie R250 0,25%).

As eletroforeses foram realizadas em condições redutoras. Foi utilizado tampão de amostra 5x com agente redutor (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, azul de bromofenol 0,1% (p/v), glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), β -mercaptoetanol 100 mM) e aquecimento da amostra à 96°C por 10 minutos.

O padrão de massa molecular usados foram o Unstained Protein Molecular Weight (Fermentas).

3.8.5 Concentração das frações purificadas por Ultrafiltração

As frações purificadas que tiveram atividade biológica baixa, mas apresentaram estímulo ao sistema reprodutor das ratas (utilizadas para a determinação a atividade biológica), foram concentradas para nova determinação de atividade biológica. A concentração foi realizada por centrifugação com dois dispositivos ultrafiltrantes. Dispositivo AMICON Centriplus Filter Device YM, com membrana de corte de 3 kDa e capacidade de 15mL de amostras; e dispositivo AMICON Ultra 10kDa NMWL Device, com 10 kDa, com. e capacidade de 15mL de amostras.

As frações foram centrifugadas à 3.000 x g, à temperatura de 4°C, em centrífuga refrigerada (Juan CR3i). As amostra concentradas foram armazenadas em tubo plástico de 2mL. Todas as amostras antes e após o processo de concentração foram mantidas em banho de gelo.

3.9 Análise estatística

A quantidade de eCG obtidas do ensaio biológico, em valores absolutos (total de UI de eCG recuperado), e relativos (UI de eCG por mg de proteína total), serão analisadas em função dos diferentes processos cromatográficos. As comparações serão feitas por análise de variância PROC GLM do SAS (2002). Os dados serão testados quanto à normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias, premissas que serão respeitadas. Será considerado um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Diafiltração do plasma com tampão Tris- HCl 0,1M, contendo NaCl 0,5M e NaN_3 0,2%, pH 7,4

O plasma foi diafiltrado com o tampão contendo Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,5M e NaN_3 0,2%, pH 7,4, durante 52 minutos, a 24°C. As condições experimentais utilizadas no método de DF estão sumarizadas no Quadro 1.

Tempo (min.)	Volume de plasma (mL)	Pressão do sistema (mmHg)	Frequência da bomba peristáltica (rpm)
0	1000	80	50
10	820	75	50
24	750	110	95
38	610	100	90
52	590	Final	Final

Quadro 1 - Condições experimentais do processo de diafiltração do plasma de éguas prenhes (n= 4) com 69 dias de gestação em média

Pool de plasma	Volume (mL)	Atividade (UI/mL)	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade específica (mUI/mg de proteína)
Antes da DF	1000	3,63	66,2	66.250	54,8
Após a DF	590	5,14	88,4	52.156	58,1

Quadro 2 - Diafiltração do plasma em tampão Tris-HCl 0,1M com NaCl, 0,5M e NaN_3 0,2%, pH 7,4

A curva de calibração referente aos resultados de concentração protéica e curva de calibração referente aos resultados de atividade biológica estão descritas nos apêndices A e B, respectivamente. A concentração de proteínas totais no plasma de éguas prenhes foi de 66,25mg/mL, em um volume de 1000mL. Após o processo de DF, a concentração encontrada foi de 86,40mg/mL, em 590mL de plasma (Quadro 2).

4.2 Purificação do plasma por cromatografia de afinidade em coluna de Blue-Sepharose FF

Na purificação do plasma em resina de Blue Sepharose FF (BS) foram observados dois picos de absorbância em comprimento de onda de 280nm. No Gráfico 1 estão apresentadas duas corridas sucessivas.

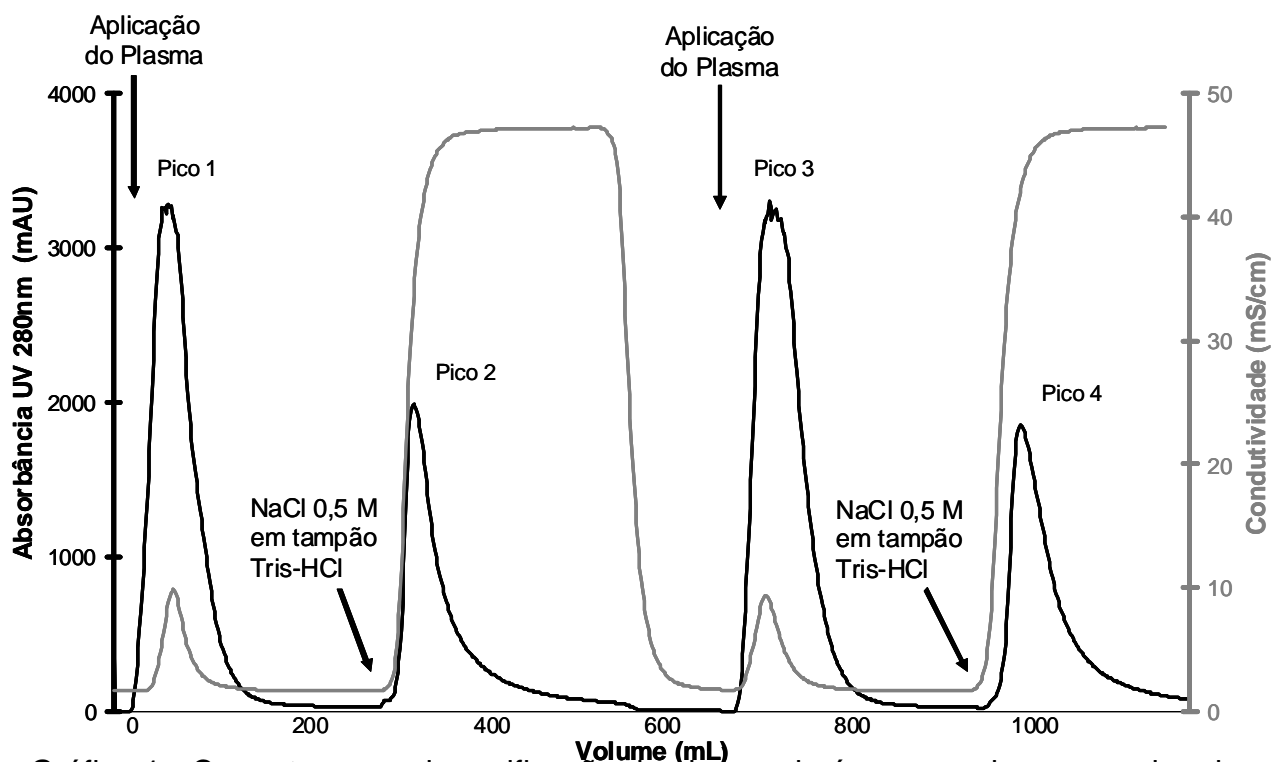


Gráfico 1 - Cromatograma da purificação de plasma de éguas prenhes em resina de afinidade, Blue Sepharose FF

Amostra	Volume (mL)	Atividade Biológica (UI/mL)	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (UI)
Plasma	20,0	3,63	66,2	1324,9	72,6
Pico 1	100,0	Sem atividade	12,6	1262,8	-
Pico 2	230,0	3,50	4,4	1020,5	805,0
Plasma	20,0	3,63	66,2	1324,9	72,6
Pico 3	100,0	Sem atividade	12,0	1201,0	-
Pico 4	222,5	3,50	3,8	868,0	778,7

Quadro 3 - Purificação em resina de afinidade Blue Sepharose FF do plasma de éguas prenhes

A curva de calibração referente à concentração protéica e a atividade biológica estão descritas nos apêndices A e B, respectivamente. Na primeira cromatografia, após aplicação 20mL de plasma (proteína total de 1324,9mg e atividade biológica de 3,63UI/mL - Quadro 3), observou-se a emergência de um primeiro pico de absorvância, que corresponde às proteínas que não se ligaram à resina (Pico 1 - “flow through” - Gráfico 1), de mais de 3000mAU (280nm). O Pico 1 contém 1262,8mg de proteína total em um volume de 100mL e não apresentou atividade biológica (Quadro 3).

Após o reequilíbrio (com 94,5mL de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,4), iniciou-se a eluição do mesmo tampão Tris-HCl contendo NaCl 0,5M. Observou-se a emergência do Pico 2, menor que aquele observado no “flow through”, com 2000mAU de amplitude. O Pico 2 contém 1020,5mg em um volume de 230mL e atividade biológica de 3,50UI/mL.

Após a primeira corrida, a coluna foi equilibrada novamente com tampão sem sal (Tris-HCl 0,1M, pH 7,4). Na segunda corrida, também foram aplicados 20mL de plasma e observou-se um perfil cromatográfico semelhante ao observado na primeira purificação. Um primeiro pico de absorvância (Pico 3 - 2º “flow through” - Gráfico 1), com mais de 3000mAU em absorvância de 280nm, contendo 1200,9mg de proteína, volume de 100 mL, e sem atividade biológica (Quadro 3).

Com a eluição do tampão Tris-HCl 0,1M contendo NaCl 0,5M, observou-se a emergência de um novo pico de absorvância (Pico 4 - Gráfico 1) semelhante ao detectado durante a primeira corrida, novamente com amplitude menor que o 2º “flow through” (2000mAU). Foram recolhidos 222,5mL, que continham 868,0mg de proteína e atividade biológica de 3,50UI/mL (Quadro 3).

No presente estudo foram encontradas concentrações protéicas de 4,43 e 3,85mg/mL (Quadro 3), das frações que se ligaram à resina, após a eluição do tampão contendo NaCl 0,5M (Picos 2 e 4 - Gráfico 1). Considerando que a concentração de proteína no plasma inicial era de 66,24mg/mL, houve uma redução na concentração de proteína em aproximadamente 16 vezes. Sendo a atividade biológica, por volume de amostra, da mesma ordem de grandeza antes e após a purificação. Pode-se inferir que o fator de purificação de plasma em BS tenha sido de aproximadamente de 16 vezes.

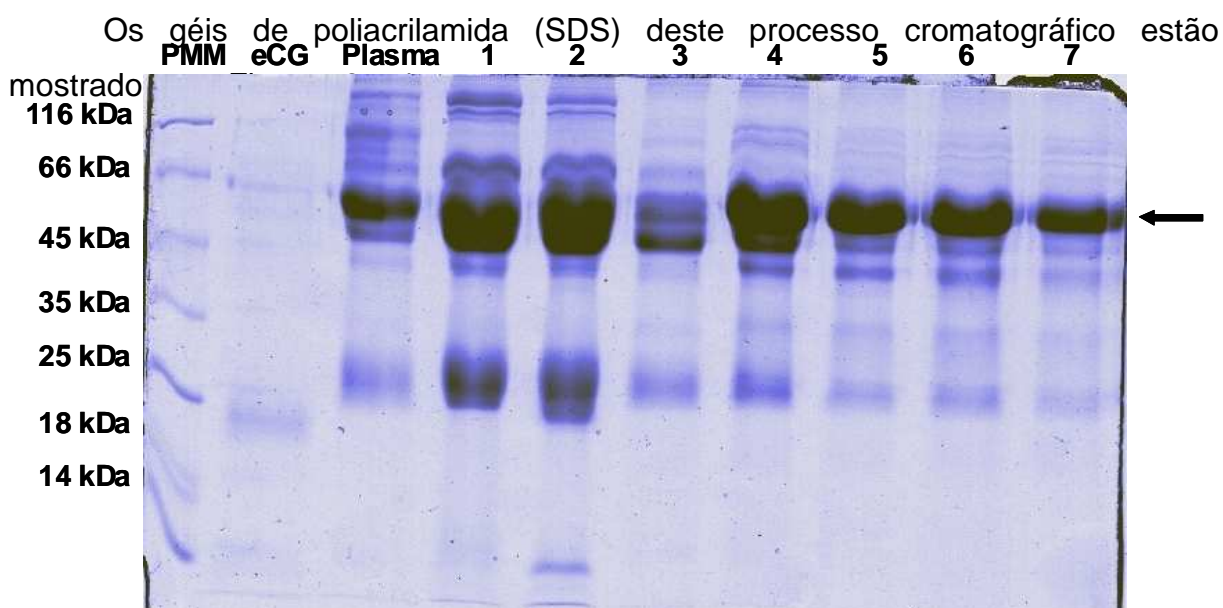


Figura 3 - Gel em poliacrilamida (12%) corado por Coomassie Blue da primeira corrida da purificação de plasma de águas prenhes em resina de Blue Sepharose FF. PMM - Padrão de massa molecular (kDa); eCG -, padrão internacional de eCG; Plasma - "pool" de plasma de 4 éguas prenhes; Canaletas 1 e 2 - frações do Pico 1 - corresponde às frações que contém as proteínas que não foram adsorvidas na coluna; Canaletas 3, 4, 5, 6, e 7 - frações do Pico 2 - corresponde à frações eluídas com o tampão Tris-HCl 20mM contendo NaCl 0.5M

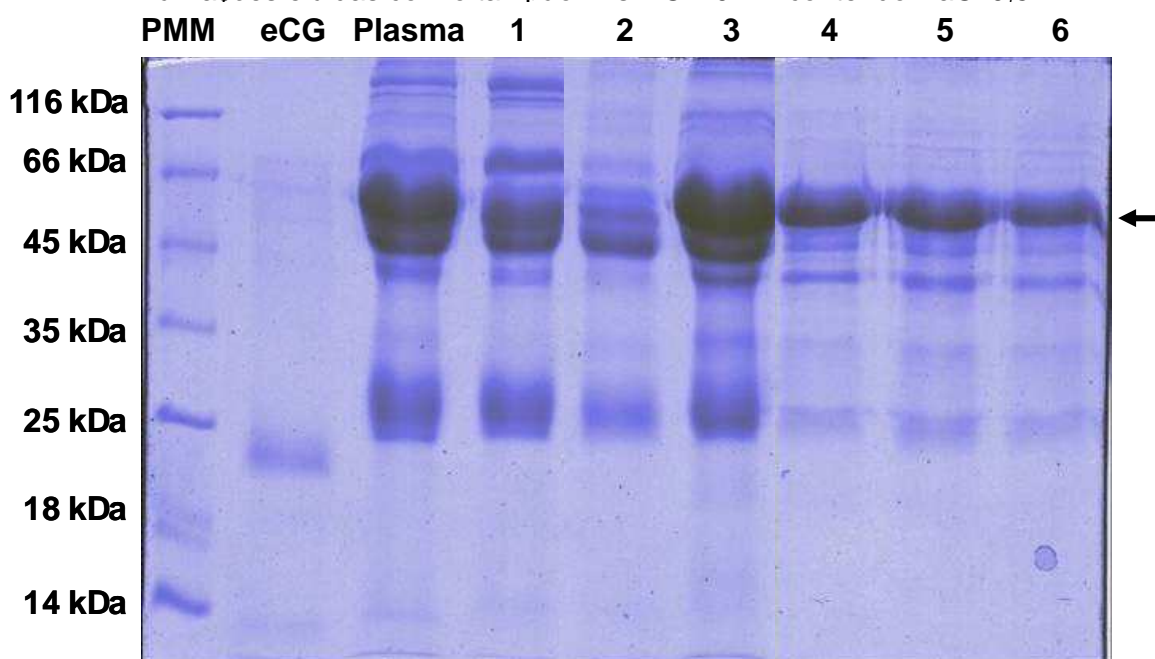


Figura 4 - Gel em poliacrilamida (12%) corado por Coomassie Blue, da segunda cromatografia do "pool" de plasma de águas prenhes em resina de Blue Sepharose FF. PPM - Padrão de massa molecular (kDa); eCG - Padrão internacional de eCG; Plasma - "pool" de plasma de éguas prenhes; Canaletas 1 e 2 - frações do Pico 3 - corresponde às frações que contém as proteínas que não foram adsorvidas na coluna; Canaletas 3, 4, 5 e 6 - frações do Pico 4 - corresponde à frações eluídas com o tampão Tris-HCl 20mM contendo NaCl 0,5M

Nos géis de poliacrilamida (SDS) mostrados nas Figuras 3 e 4 é possível ver uma banda forte de massa molecular um pouco menor que 66 kDa, que corresponde a albumina (entre 66 e 45 kDa), presente em todas as amostras.

4.3. Purificação por cromatografia de afinidade com ConA-Sepharose 4B

4.3.1 Cromatografia das frações purificadas que adsorveram a Blue Sepharose FF

As frações eluídas da resina BS com tampão Tris-HCl contendo 0,5M de NaCl foram reunidas (volume final de 150mL) foram aplicados à coluna com resina Concanavalina A - Sepharose 4B (ConA). Este “pool” foi chamado de Amostra Aplicada 1 (Quadro 4).

Amostra	Volume (mL)	Atividade (UI/mL)	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade Total (UI)	Rendimento (%)
Aplicada1	150	3,50	7,7	1152,0	525	100,00
Pico 1	250	-	1,2	307,5	-	
Pico 2	200	Sem atividade	1,0	209,1	-	
Pico 3	100	3,65	2,1	21,4	365	69,52

Quadro 4 - Purificação em resina de afinidade Concanavalina A - Sepharose 4B das frações que adsorveram a BS

A curva de calibração referente aos resultados de concentração protéica e curva de calibração referente aos resultados de atividade biológica estão descritas nos apêndices A e B, respectivamente. No Gráfico 2 está representado o cromatograma desta corrida. As proteínas adsorvidas na coluna foram eluídas concentrações crescentes de α -metilglucosídeo (20, 100 e 300mM) em tampão Tris-HCl 0,1M, 0,5M de NaCl pH 7,4.

Após a aplicação da amostra (proteína total de 1152,0mg e atividade biológica de 3,50UI/mL - Quadro 4) observou-se a emergência de um primeiro pico de absorbância, que corresponde às proteínas que não se ligaram à resina (Pico 1 - “flow through” - Gráfico 2) de mais de 300mAU de absorbância.

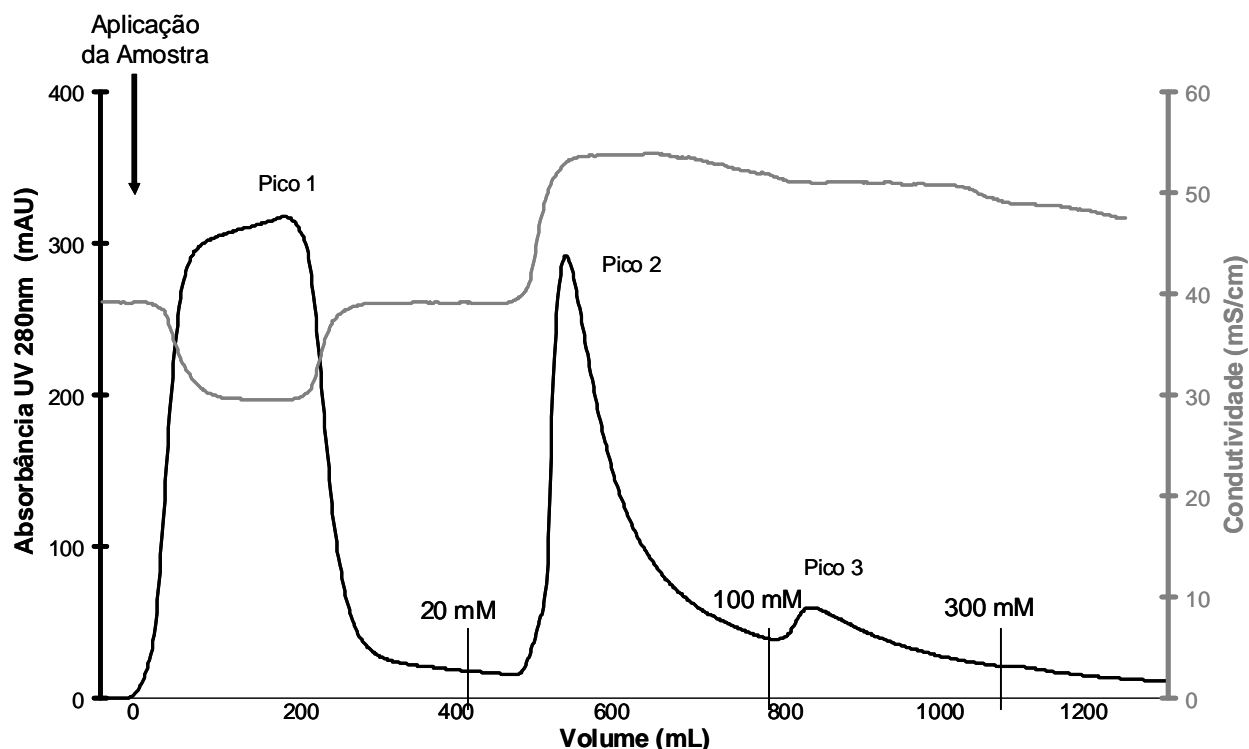


Gráfico 2 - Cromatograma da purificação das frações que adsorveram a BS em resina de afinidade, Concanavalina A - Sepharose 4B

O Pico 1 continha 307,5mg de proteína total, concentração de 1,2mg/mL e volume de 250mL. Após o reequilíbrio da coluna, com 80mL de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,4), iniciou-se a eluição do mesmo tampão contendo 20mM de α -metilglucosídeo (Gráfico 2). Observou-se a emergência do Pico 2 (Gráfico 2), que não apresentou atividade biológica (Quadro 4). O teste de atividade biológica foi feito inicialmente com uma amostra da fração do pico sem nenhum tratamento posterior à coleta feita no dia da corrida cromatográfica. Como não foi observada atividade biológica, as frações do pico 2 foram reunidas e concentradas para possibilitar a injeção nos animais usados no teste de atividade biológica uma quantidade maior de proteínas. As frações coletadas referentes ao Pico 2 foram reunidas e concentradas pelo método de ultrafiltração, utilizando membranas com um peso molecular de exclusão de 3kDa (filtro AMICON centriplus filter device YM) e 10kDa (filtro AMICON ultra 10kDa NMWL device). Após a ultracentrifugação nos 2 filtros, foi realizado ensaio biológico com ratas impúberes, entretanto, não foi encontrada atividade biológica. Os dados dos resultados dos ensaios biológicos encontram-se no apêndice C.

Com a eluição do tampão contendo 100mM de α -metilglucosídeo, observou-se a emergência do Pico 3 (Gráfico 2). As frações correspondentes ao Pico 3

continham inicialmente uma atividade biológica de 3,65UI/mL (Quadro 4). Estas amostras também foram reunidas e concentradas por centrifugação com os mesmos dispositivos citados acima e realizado o ensaio biológico. Ao contrário do esperado, não foi encontrada atividade biológica nas frações concentradas.

Não foi observado nenhum pico de absorvância com a eluição do tampão contendo 300mM de α -metilglucosídeo (Gráfico 2).

Conforme representado no Quadro 3, verificou-se um rendimento de purificação de 69,52% das frações purificadas que compõem o Pico 2 (Quadro 4).

Nas Figuras 5 e 6 estão demonstrados os géis de eletroforese correspondentes a purificação em coluna de ConA-Sepharose 4B com as frações purificadas que adsorveram a Blue Sepharose FF.

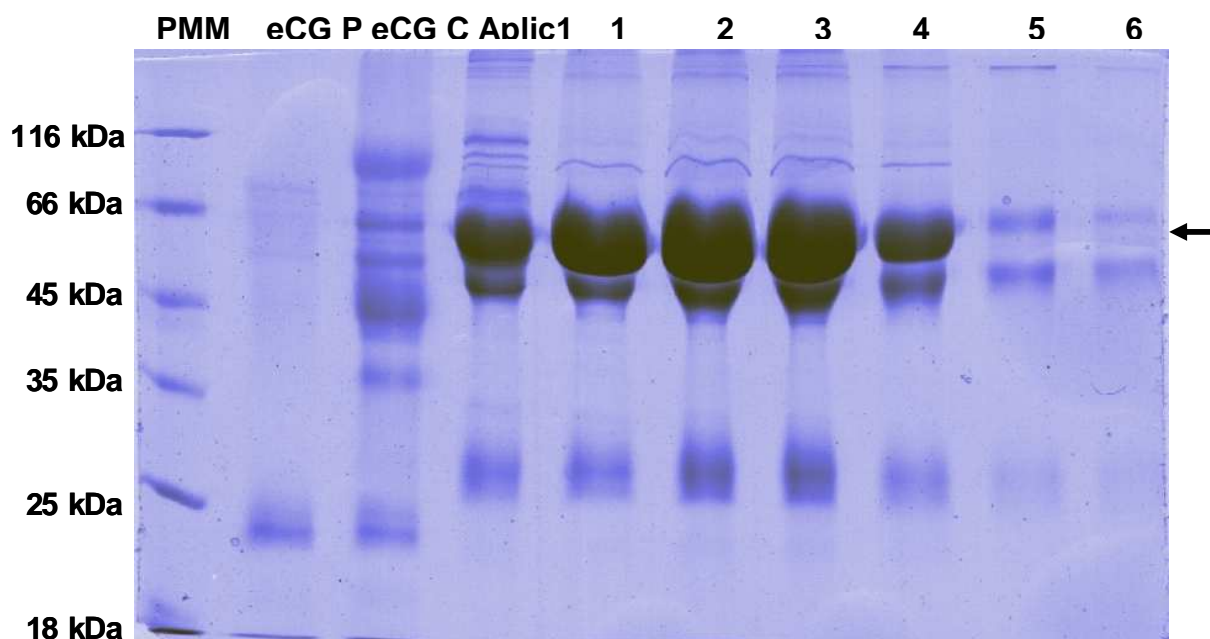


Figura 5 - Gel em poliacrilamida (12%) corado por Coomassie Blue, da purificação em ConA Sepharose 4B da fração que corresponde ao pico eluído da coluna de BS com tampão Tris-HCl contendo NaCl 0,5M. PPM - Padrão de peso molecular, eCG P - Padrão internacional de eCG, eCG C - eCG comercial (Folligon - Intervet-Schering®), Aplic1 - fração eluída da coluna de BS, Canaletas 1, 2, 3, 4, 5 - frações que não adsorveram na ConA ("flow through"), e Canaletas 6 - fração eluída com tampão de 20mM de α -metilglucosídeo

Na Figura 5 pode-se verificar que a amostra aplicada (Aplicada I - Figura 5) e as frações que não adsorveram a ConA (Canaletas 1, 2, 3, 4 e 6 - Figura 5), contêm albumina (banda protéica com aproximadamente 60kDa). Já nas frações que adsorveram a resina (Canaleta 7 - Figura 5 e Canaletas 1, 2, 3, 4, 6 e 7 - Figura 6),

podemos verificar uma redução da presença da albumina, comprovando que a albumina não tem afinidade com a ConA.

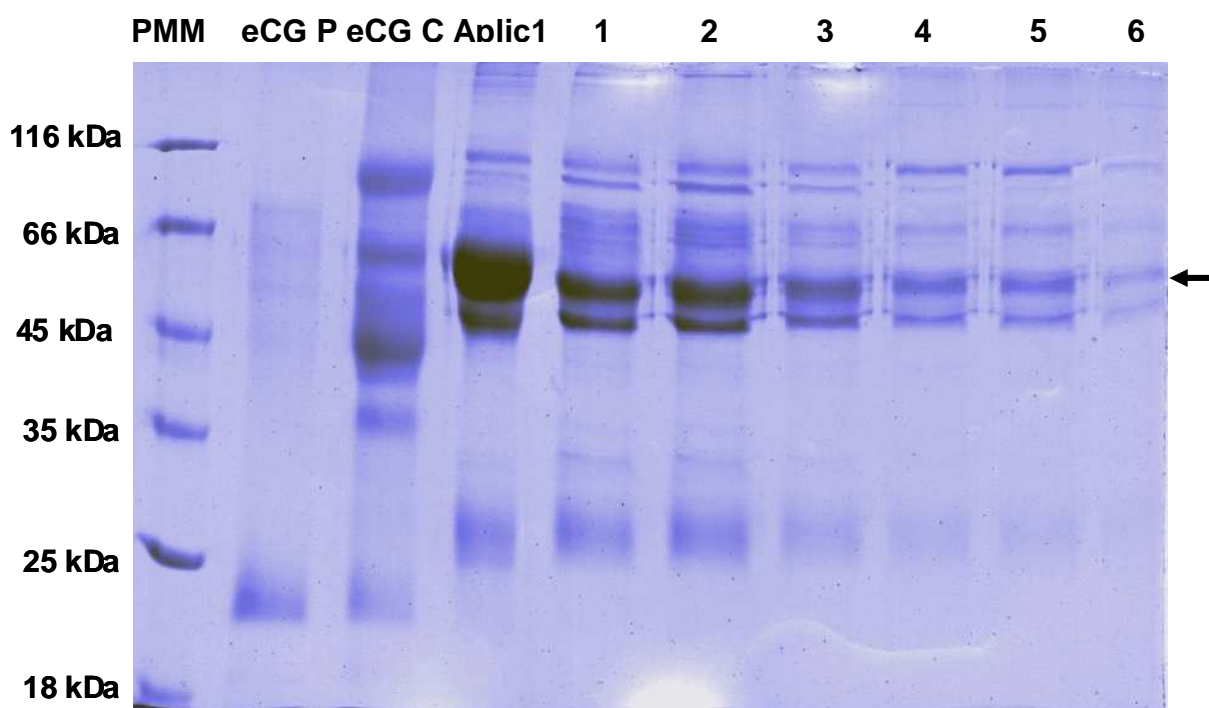


Figura 6 - Gel em poliacrilamida (12%) corado por Coomassie Blue, da purificação em ConA Sepharose 4B da fração que corresponde ao pico eluído da coluna de BS com tampão Tris-HCl contendo NaCl 0,5M. PPM - Padrão de peso molecular, eCG P - Padrão internacional de eCG, eCG C - eCG comercial (Folligon Intervet-Schering®), Aplic1 - fração eluída da coluna de BS, Canaletas 1, 2, 3, - frações eluídas com tampão de 20mM de α -metilglucosídeo - frações que não adsorveram na ConA ("flow through"), e Canaletas 4, 5 e 6 - fração eluída com tampão de 100mM de α -metilglucosídeo

Não se pode verificar a presença da eCG nas eletroforeses, comparando-se as frações que adsorveram a resina (Canaleta 7 - Figura 5 e Canaletas 1, 2, 3, 4, 6 e 7 - Figura 6) com padrão internacional, e com a eCG comercial (eCG P e eCG C - Figuras 5 e 6). Entretanto foi verificada atividade biológica no Pico 3 (3,65UI/mL - Quadro 3).

4.3.2 Cromatografia das frações purificadas que não adsorveram à Blue Sepharose FF

As frações protéicas que não adsorveram a resina BS foram reunidas e 170mL (proteína total de 2130,7mg - Quadro 5) deste pool foram posteriormente

aplicadas à coluna com resina Concanavalina A - Sepharose 4B (ConA), que foi denominado Amostra Aplicada 2 (Quadro 5).

Amostra	Volume (mL)	Atividade (UI/mL)	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
Aplicada 2	170	Sem atividade	12,5	2130,7
Pico 1	250	-	5,0	1244,7
Pico 2	190	-	2,6	493,4
Pico 3	50	-	2,1	103,8

Quadro 5 - Purificação em resina de afinidade Concanavalina A - Sepharose 4B das frações que não adsorveram a BS

A curva de calibração referente aos resultados de concentração protéica e curva de calibração referente aos resultados de atividade biológica estão descritas nos apêndices A e B, respectivamente.

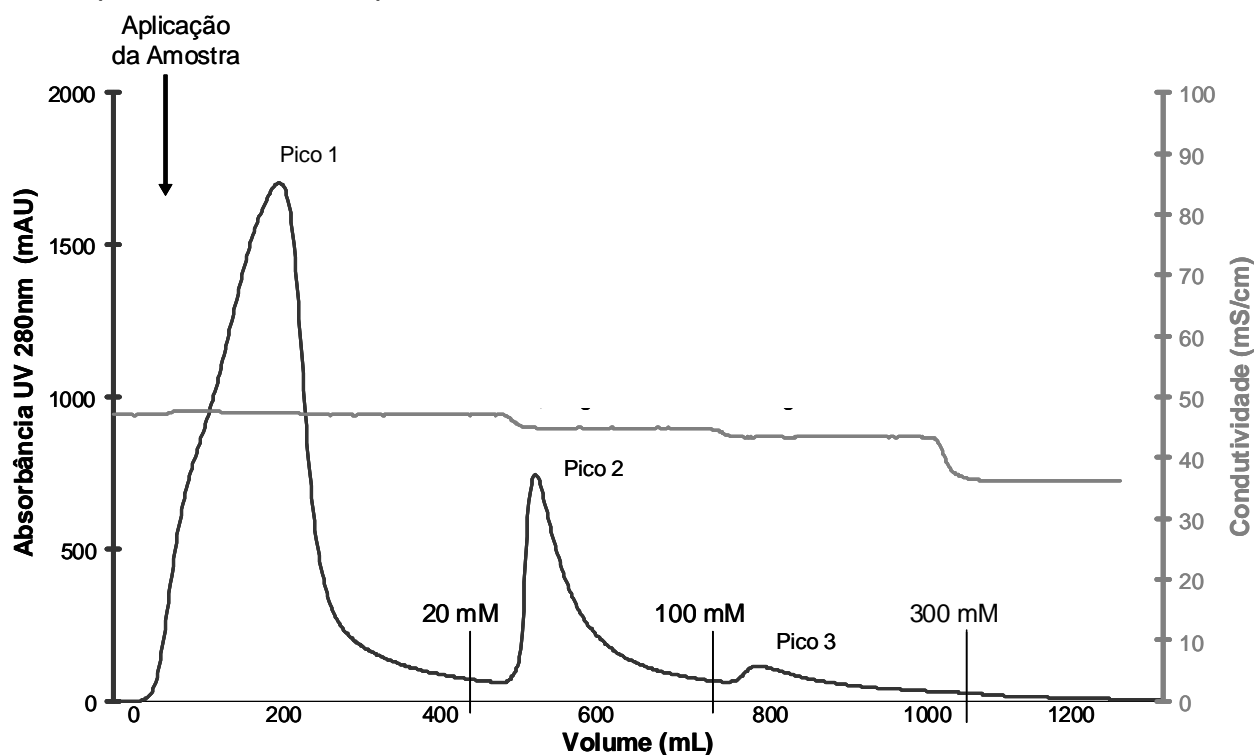


Gráfico 3 - Cromatograma da purificação das frações que não adsorveram a BS em resina de afinidade, Concanavalina A - Sepharose 4B

Após a aplicação da amostra (proteína total de 2130,7mg - Quadro 5) observou-se a emergência de um primeiro pico de absorbância, que corresponde às proteínas que não se ligaram à resina (Pico 1 - “flow through” - Gráfico 3) de mais de 1500mAU (280nm). O Pico 1 contém 1244,7mg de proteína total, concentração de 5,0mg/mL e volume de 250mL (Quadro 5).

Após o reequilíbrio (com 180mL de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,4) iniciou-se a eluição do mesmo tampão contendo 20mM de α -metilglucosídeo (20mM - Gráfico 3). Observou-se a emergência do Pico 2, menor que aquele observado no “flow through”, com 800mAU de amplitude (Gráfico 3). O Pico 2 contém 493,4mg de proteína total, 2,60mg/mL de concentração e volume 190mL (Quadro 5).

Após a eluição do tampão contendo 100mM de α -metilglucosídeo, observou-se a emergência do Pico 3, menor que o Pico 2, com menos de 100mAU amplitude (Gráfico 3). O Pico 3 contém 103,8mg de proteína total, 2,08mg/mL de concentração e volume de 50mL (Quadro 5). Não foi observado pico de absorvância significativo após a passagem do tampão contendo 300mM de α -metilglucosídeo.

4.3.3 Cromatografia do plasma diafiltrado

Foram aplicados à coluna com resina de Concanavalina A - Sepharose 4B (ConA) 40mL de plasma diafiltrado (proteína total de 3456,0mg e atividade biológica de 5,14UI/mL - Quadro 6).

Amostra	Volume (mL)	Atividade (UI/mL)	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade Total (UI)	Rendimento (%)
Diafiltrado	40	5,14	88,4	3456,0	206	100,00
Pico 1	250	-	6,8	1697,2	-	-
Pico 2	195	Sem atividade	2,5	498,0	-	-
Pico 3	50	Sem atividade	0,4	21,5	-	-

Quadro 6 - Purificação em Concanavalina A - Sepharose 4B do plasma diafiltrado

A curva de calibração referente aos resultados de concentração protéica e curva de calibração referente aos resultados de atividade biológica estão descritas nos apêndices A e B, respectivamente.

Durante a eluição da amostra observou-se a emergência de um primeiro pico de absorvância, que corresponde às proteínas que não se ligaram à resina (Pico 1 - “flow through” - Gráfico 4) de mais de 3000mAU (280nm).

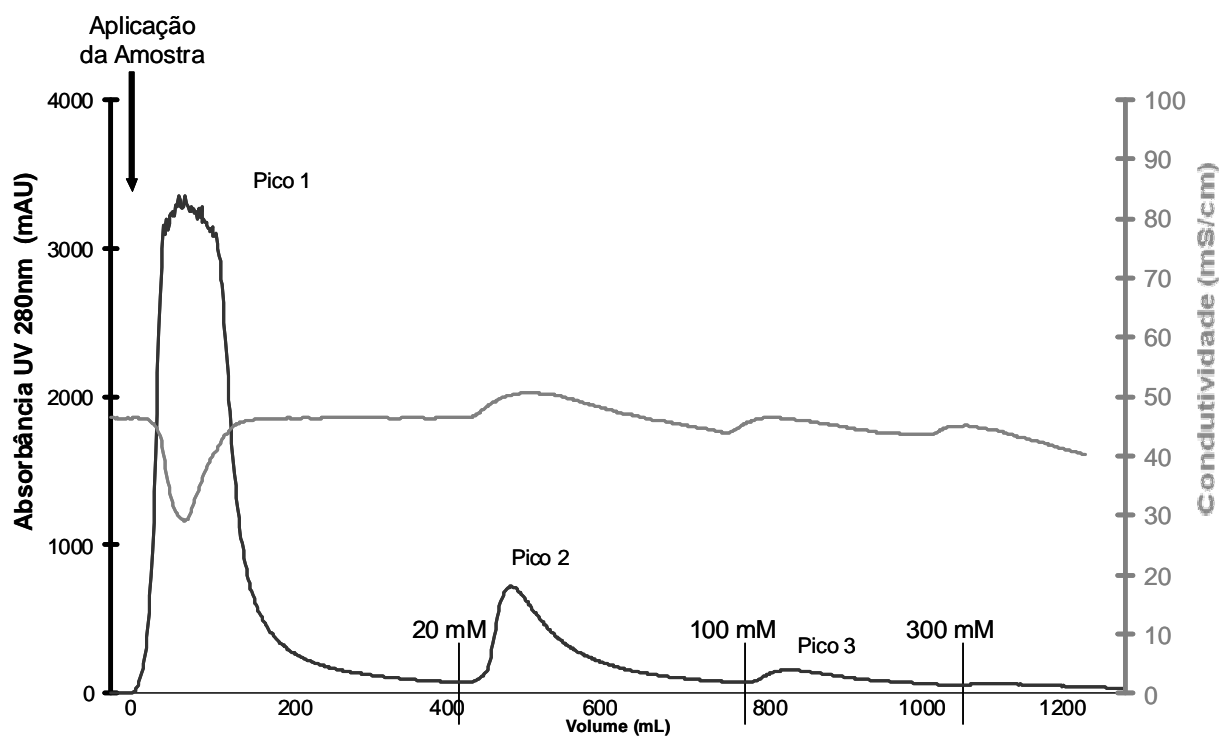


Gráfico 4 - Cromatograma da purificação do plasma diafiltrado, em resina de afinidade, Concanavalina A - Sepharose 4B

O Pico 1 contém 1697,2mg de proteína total, concentração de 6,8mg/mL e volume de 250mL. Após o reequilíbrio com 100mL de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,4, iniciou-se a eluição do mesmo tampão contendo 20mM de α -metilglucosídeo (20mM - Gráfico 4). Observou-se a emergência do Pico 2, menor que aquele observado no “flow through”, com 800mAU de amplitude (Gráfico 4). O Pico 2 contém 498,0mg (2,5mg/mL), volume de 195mL e não apresentou atividade biológica (Quadro 6). Após a eluição do tampão contendo 100mM de α -metilglucosídeo, observou-se a emergência do Pico 3, menor que o Pico 2, com menos de 100mAU amplitude (Gráfico 4). O Pico 3 contém 21,5mg de proteína total, concentração de 0,4mg/mL, volume de 50mL, sem atividade biológica (Quadro 6).

Como não foi observada atividade biológica, as frações do pico 3 foram reunidas e concentradas para possibilitar a injeção de uma quantidade maior de proteínas nos animais usados no teste de atividade biológica. O Pico 3 foi concentrado usando membranas de 3 kDa e 10kDa de corte, mas não foi encontrada atividade biológica nas frações concentradas. Os resultados dos ensaios biológicos encontram-se no apêndice C.

5 DISCUSSÃO

5.1 Diafiltração do plasma com tampão Tris- HCl 0,1M, contendo NaCl 0,5M e NaN₃ 0,2%, pH 7,4

A diafiltração (DF) foi utilizada no presente estudo com o objetivo de preparar a amostra de plasma obtido de éguas prenhes, para posterior purificação por cromatografia de afinidade. O processo de DF mostrou-se eficiente quanto à recuperação de proteína total (79%) e manutenção da atividade biológica, uma vez que a atividade específica de eCG antes e após a DF foi de 54,8mUI/mg de proteína e 58,1mUI/mg de proteína (Quadro 2). Este processo também se mostrou eficiente para Ayres et al. (2007) e Gené et al. (2007). Eles observaram a manutenção da atividade biológica de eCG na DF partindo-se de um “pool” de plasma de três éguas prenhes, com 60 dias de gestação em média, com o emprego do mesmo dilalizador (cartucho de hemodiálise, com membrana de diacetato de celulose, área de 2,1m² e corte de 5kDa). Estes autores obtiveram atividades específicas de 3,6UI/mg e 4,0UI/mg, antes e após a DF, respectivamente. Gonzales et al. (1998) descrevem o uso da DF na preparação da amostra de plasma de éguas prenhes para o desenvolvimento de processo de obtenção de eCG em escala industrial por cromatografia, usando cartucho para hemodiálise com membrana de fibra de polissulfona com 1,8 m² de área filtrante e corte de 5kDa. Entretanto, os autores não relataram dados sobre a recuperação de proteína e atividades específicas das amostras antes e após o processo de DF.

5.2 Purificação do pool de plasma por cromatografia de afinidade em coluna de Blue-Sepharose FF

A resina Blue Sepharose FF (BS) foi escolhida para a purificação porque ela já foi usada anteriormente para purificação de eCG e de gonadotrofina coriônica de

outros eqüídeos (McFARLANE et al., 1991). É uma resina conhecida principalmente para a purificação de albumina, mas também pode ser utilizada para purificação e outras proteínas como interferon, lipoproteínas e fatores de coagulação e também proteínas que requerem NAD como cofator. A atividade biológica de 3,50UI/mL (Quadro 3) foi encontrada nos Picos 2 e 4, que correspondem às frações das proteínas que se ligaram à BS, nas condições cromatográficas utilizadas. Este resultado também foi observado por McFarlane et al. (1991).

A atividade biológica encontrada no plasma, no presente estudo (3,63UI/mL) é aproximadamente 20 vezes menor que o descrito na literatura para éguas prenhes. Segundo Allen (1969), e Murphy e Martinuk (1991) a atividade biológica da eCG aos 60 dias de gestação encontra-se entre 60 e 80UI/mL. Gonzales et al. (1998) encontraram a atividade biológica de 52UI/mL, no plasma de éguas prenhes com média de 72 dias de gestação. Aleixo et al. (1995) verificaram atividades de 72, 93, 89 e 65UI/mL, em 4 éguas com 58, 65, 72 e 85 dias de gestação. Virmani et al. (2003) obtiveram atividade biológica de 97UI/mL do soro de diferentes pôneis fêmeas com média de 85 dias de gestação.

Uma possível explicação para esta perda de atividade biológica foi o tempo em que as amostras permaneceram congeladas até se realizar o ensaio de atividade biológica. As amostras de plasma foram acondicionadas a -56°C durante 12 meses, período muito maior que o descrito em trabalhos encontrados na literatura. Ayres et al. (2007) e Gené et al. (2007) preservaram o plasma DF e não DF a -80° C, por um período máximo de seis meses, antes da realização dos estudos de atividade biológica. É possível que a estocagem do plasma de éguas prenhes por um período maior que seis meses a uma temperatura superior a -80°C reduza a atividade biológica das amostras estocadas. Também não se pode descartar a hipótese que congelamentos e descongelamentos sucessivos determinam perdas na atividade biológica, razão pela qual, vários autores (McFARLANE et al., 1991; GONZALES et al., 1998; VIRMANI et al., 2003) liofilizaram as frações cromatográficas, mesmo em etapas intermediárias das purificações. A liofilização das amostras para a diminuição da perda de atividade biológica de eCG será testada em experimentos futuros.

É sabido que a glicosilação do eCG tem papel fundamental na manutenção da estabilidade desta proteína. A glicosilação pode variar de conceito para conceito, e quanto maior a quantidades de açúcar, maior a atividade biológica

(MURPHY; MARTINUK, 1991; MURPHY et al., 1991). A eCG é a gonadotrofina mais intensamente glicosilada que se conhece (45% de seu peso molecular corresponde a açúcar), e que o ácido siálico (ácido acetil neurâmico) é o açúcar presente em maior quantidade na molécula (MURPHY; MARTINUK, 1991; LEGARDINIER et al., 2005). É possível que ocorra perda de açúcar durante o processo cromatográfico, entretanto, devido à baixa atividade observada no plasma. Mas não é possível saber se a perda de atividade ocorreu antes de aplicar o plasma nas colunas cromatográficas ou após os processos cromatográficos. Com a presença de atividades biológicas muito baixas não foi possível calcular a atividade específica e atividade total deste processo cromatográfico.

Uma questão importante para a purificação de eCG é saber a capacidade de adsorção desta molécula à resina de BS. A relação quantidade de proteína aplicada por volume de resina utilizada neste estudo foi de 53mg de proteína por mL de BS. Como não foi observada atividade de eCG nas frações que não adsorveram a resina (“flow through”), poderíamos supor que a coluna ainda não estava saturada. Entretanto, Ayres et al. (2007), aplicaram 11,9mg de proteína/mL de resina e observaram atividade no “flow through” (15,53UI/mL). Como as atividades observadas no presente trabalho foram baixas, é possível que a atividade que poderia estar no “flow through”, o que indicaria a saturação de eCG na coluna, tenha sido perdida durante a longa estocagem das amostras.

Ayres e colaboradores (2007) usaram tampão fosfato para o processo cromatográfico. No presente estudo, o tampão Tris-HCl foi escolhido porque o seu uso está recomendado no manual do fabricante da resina e porque é o mesmo tampão utilizado na cromatografia subsequente em resina com ConA, evitando a manipulação das frações purificadas para troca do tampão.

Nos géis de SDS-PAGE mostrados nas Figuras 3 e 4 é possível ver uma banda forte de massa molecular um pouco menor que 66 kDa, que corresponde à albumina (entre 66 e 45 kDa), presente em todas as amostras. Portanto, a fração enriquecida de eCG contém albumina como contaminante. A resina BS, segundo a sua fabricante GE Healthcare (2005a), tem capacidade de adsorção de 20mg de albumina por mililitro de resina. No presente estudo utilizou-se uma coluna com 50mL de resina e, conseqüentemente, com capacidade de adsorver 1000mg de albumina. Aplicou-se 1325mg (Quadro 3) de proteína total em cada corrida, o que

explica a presença de albumina nas frações do “flow through”. Para eliminar a albumina e outras proteínas contaminantes não glicosiladas, foi empregada uma segunda etapa de purificação em resina de Concanavalina A (ConA).

5.3 Cromatografia de afinidade em coluna de ConA-Sepharose 4B

A resina ConA foi escolhida como estratégia de purificação por ter afinidade a glicoproteínas, polissacarídeos e glicopeptídios (DUFAU, 1972; HAGE, 1999), como a eCG (MURPHY; MARTINUK, 1991) e hCG (MANJUNATH; SAIRAM, 1982), que apresentam estruturas bastante semelhantes. Tanto a eCG como o hCG apresentam as subunidades α idênticas e as subunidade β com alta porcentagem de galactose e ácido siálico (MURPHY; MARTINUK, 1991).

O tampão de adsorção (Tris-HCl) e o açúcar α -metilglucosídeo (utilizado para eluir as glicoproteínas que possuem afinidade com a ConA) foram escolhidos para este processo cromatográfico por que já foram usados por outros pesquisadores para purificação de gonadotrofinas coriônicas (MANJUNATH; SAIRAM, 1982; McFARLANE et al., 1991; GENÉ et al., 2007). Entretanto, no presente estudo, foram usadas 3 concentrações crescentes de α -metilglucosídeo (20, 100 e 300mM) para o tampão de eluição. Manjunath e Sairam (1982), e Gené e colaboradores (2007) usaram apenas uma concentração de 300mM de α -metilglucosídeo para eluição. McFarlane et al. (1991) usaram um tampão de eluição contendo 200 mM. Ao utilizar tampão com concentrações crescentes de açúcar, pôde-se lavar a resina de ConA com uma concentração menor de α -metilglucosídeo (20mM). Isto permitiu a eluição de glicoproteínas contaminantes no primeiro pico (Pico 2 - Gráficos 2), mantendo a eCG adsorvida a resina. Com a eluição da eCG, com tampão contendo 100mM de α -metilglucosídeo, obteve-se um pico protéico com atividade biológica (Pico 3 - 3,65UI/mL - Quadro 4) e com menos contaminantes (Canaleta 4, 5 e 6 - Figura 6).

Para comprovar que a eCG eluiu apenas no pico 3, e que as possíveis perdas de atividade na estocagem ou na manipulação da eCG não influenciaram no resultado do ensaio biológico do pico 2 (ausência de atividade - Quadro 4), as frações purificadas do pico 2 e 3 foram reunidas e concentradas pelo método de

ultrafiltração, utilizando membranas com um peso molecular de exclusão de 3kDa (filtro AMICON centriplus filter device YM) e 10kDa (filtro AMICON ultra 10kDa NMWL device). Após a ultracentrifugação nos 2 filtros, foi realizado ensaio biológico com ratas impúberes. Como esperado, não foi encontrada atividade biológica nas frações filtradas do pico 2. Entretanto, também não foi encontrada atividade no pico 3 após a concentração. Ao encontrar atividade biológica em uma fração do pico 3 (3,65UI/mL - Quadro 4), esperava-se encontrar maior atividade biológica ao concentrar todas as frações purificadas do pico 3. Provavelmente ocorreu perda de atividade biológica no processo de filtração, ou a perda foi causada pelo armazenamento das frações purificadas congeladas antes do processo de filtração. Evitando-se o sacrifício desnecessário de ratas, o ensaio biológico das frações purificadas do pico 1 não foi realizado, já que foi encontrada atividade biológica nas frações eluídas com 100mM de α -metilglucosídeo (pico 3 - Quadro 4).

No presente estudo foi encontrado rendimento de 69,52% (Quadro 4). É importante ressaltar que a possibilidade do cálculo do rendimento só ocorreu por que o volume da amostra aplicada (150mL - Amostra Aplicada 1 - Quadro 4) é maior que o volume obtido nas frações eluídas no pico 3 (100 ml), e que as atividades biológicas encontrada são semelhantes. Como a atividade biológica encontrada é muito baixa, o rendimento deste processo cromatográfico foi calculado apenas para a ilustração de possível demonstração de eficácia deste método de purificação da eCG. Este rendimento poderá ser comprovado com a repetição do mesmo processo cromatográfico em condições que evitem a perda de atividade biológica do plasma e das frações purificadas.

Dentre os trabalho encontrados na literatura, Gonzales et al. (1998) obtiveram os maiores valores de rendimento e fator de purificação. Estes resultados foram obtidos empregando-se resinas de troca iônica, que de um modo geral, são resinas com preço menor que as resinas de afinidade, e são recomendadas em escalonamentos. Em experimentos futuros serão empregadas resinas de troca iônica para cálculo de rendimento, do fator de purificação e dos custos de utilização, para possível escalonamento.

Os ensaios biológicos da purificação em ConA, das frações que não adsorveram na BS, não foram realizados devido à ausência de atividade biológica da amostra aplicada (Amostra Aplicada 2 - Sem atividade biológica - Quadro 5)

Já nas frações purificadas em ConA do plasma diafiltrado, esperava-se encontrar atividades biológicas maiores que nos processos cromatográficos anteriores. Com o plasma mais concentrado (por DF), aplicou-se a coluna de ConA uma amostra com maior quantidade protéica e maior atividade biológica (5,14UI/mL - Diafiltrado - Quadro 6) que o plasma sem DF. Entretanto não foi encontrada atividade biológica nas frações eluídas com 20mM e 100mM de α -metilglucosídeo (Pico 2 e 3 - Sem atividade - Quadro 6). Ao encontrar perfil cromatográfico semelhantes ao processo cromatográfico anterior (Gráfico 2) e não encontrar atividade biológica em nenhum dos dois picos, as frações do pico 3 foram reunidas e concentradas pelo método de ultrafiltração, utilizando membranas com um peso molecular de exclusão de 3kDa (filtro AMICON centriplus filter device YM) e 10kDa (filtro AMICON ultra 10kDa NMWL device). Após a ultracentrifugação nos 2 filtros, foi realizado ensaio biológico com ratas impúberes, entretanto, não foi encontrada atividade biológica. Como não se encontrou atividade biológica na purificação em ConA com o plasma diafiltrado, não foi possível comparar os diferentes processos cromatográficos utilizados no presente estudo. A perda de atividade biológica no plasma concentrado, e nas frações purificadas, provavelmente ocorreu devido à forma de estocagem e na demora na realização dos ensaios biológicos. Evitando-se o sacrifício desnecessário de ratas, o ensaio biológico das frações purificadas do pico 1 (Quadro 6) não foi realizado.

Para verificar se as possíveis perdas de atividade foram de fato decorrentes de sucessivos congelamentos e descongelamentos ou da estocagem, seria necessário um estudo detalhado da estabilidade da eCG. Será testado realizar os processos cromatográficos e os ensaios biológicos no mesmo dia da coleta do plasma. Ou ainda liofilizar o plasma (repetindo o que fez VIRMANI et al., 2003) e as frações purificadas (McFARLANE et al., 1991; GONZALES et al., 1998) antes da realização do ensaio biológico. Além do estudo de estabilidade e da forma de estocagem da eCG, serão realizados experimentos com resinas de troca iônica, para se desenhar uma estratégia de purificação que possibilite o escalonamento do processo, com bons rendimentos e com viabilidade econômica.

6. CONCLUSÃO

A purificação em resina de afinidade Blue Sepharose FF, seguido de purificação em resina de Concanavalina A com plasma de éguas prenhes, com 60 dias de prenhes, sem diafiltração, recuperou uma quantidade satisfatória de eCG com atividade biológica.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B. B.; FARMER, S. W.; PAKOFF, H.; SEIDEL, JR G. E. Biochemical properties of equine chorionic gonadotrophin from two different pools of pregnant mare sera. **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 23-570, 1980.
- ALEIXO J. A. G.; DECHAMPS, J. C.; BORDIGON, V.; PIMENTEL, C. A.; MORAES, J. C. F. Gonadotrofina coriônica eqüina. Purificação caracterização e resposta ovariana em ovinos e suínos. **Ciência Rural**, v. 25, n. 1, p. 111-114, 1995.
- ALLEN, W. The immunological measurement of pregnant mare serum gonadotrophin. **Journal of Endocrinology**, v. 43, p. 593-598, 1969.
- ALLEN, W.; HAMILTON, D. W.; MOOR R. M. The origin of equine endometrial cups II Invasion of endometrial trofoblast. **Anatomy Research**, v. 177, p. 486-502, 1973.
- AYRES, G. R.; BERTAN, C. M.; ROSSA, L. A. F.; BINELLI, M.; CESAR, M. C.; RICHTZENHAIN, L. J. Extração e Purificação da gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) do plasma sangüíneo de égua prenhe por cromatografia de afinidade: emprego da resina Blue-Sepharose. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP/15º, 2007, São Paulo : SIICUSP, 2007. v. 1. p. 832-832.
- BARUSELLI, P. S.; JACOMINI, J. O.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3º, 2008, Londrina, PR. **Anais...** Londrina, PR, 2008. v. 1. p. 146-167.
- BESSLER, W; SHAFER, J. A.; GOLDSTEIN, I. J. A. Spectrophotometric study of the carbohydrate binding site of Concanavalin A. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 9, p. 2819-2822, 1974.
- BEATON, B.; KLINKOWSKI, C. Industrial ultrafiltration design and application of diafiltration processes. **Journal of Separation and Purification Technology**, v. 4, n. 2, p. 1-10, 1983.
- CHRISTAKOS, S.; BAHL, O. P. Pregnant mare serum gonadotropin. purification and physicochemical, biological, and immunological characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 25, n. 254, p. 4253-4261, 1979.
- COLE H. H.; HART, G. H. The potency of blood serum mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. **American Journal of Physiology**, n. 93, p. 57, 1930.
- COLE, H. H.; ERWAY, J. 48 Hour assay test for equine gonadotropin with results expressed in international units. **Endocrinology**, v. 29, p. 514-518, 1941.

COLE, H. H.; PENCHARS, R. L.; GOSS, H. On the biological properties of highly purified gonadotropin from pregnant mare serum. **Endocrinology**, v. 27, p. 548-53, 1940.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6. ed. Campinas: Unicamp, 1995. 125 p.

DUFAU M. L.; TSURUHARA, T.; CATT, K. J. Interaction of glycoproteins hormones with agarose-concanavalin A. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 278, p. 281-292, 1972.

GE-HEALTHCARE. Blue-Sepharose FF. 2005a. Disponível em: <www.ge.com>.

Acesso em:

<[http://www5.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/DD03033D4C8E2272C12570AC000DC5B5/\\$file/71705500AG.pdf](http://www5.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/DD03033D4C8E2272C12570AC000DC5B5/$file/71705500AG.pdf)>.

GE-HEALTHCARE. ConA Sepharose 4B. 2005b. Disponível em: <www.ge.com>.

Acesso em:

<[http://www4.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/2F11A36D3D1A78F6C12573940002D065/\\$file/71707700AF.pdf](http://www4.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/2F11A36D3D1A78F6C12573940002D065/$file/71707700AF.pdf)>.

GENÉ, L. A.; PONTES, E. O.; ROSSA, L. A. F.; MADUREIRA, E. H. Extração e Purificação da Gonadotrofina Coriônica Equina (ECG) do Plasma Sanguíneo de Égua Prenhe por Cromatografia de Afinidade: Emprego da Resina ConA-Sepharose. . In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP/15º, 2007, São Paulo : SIICUSP, 2007. v. 1. p.2822-2822.

GONZALEZ, G.; CASTRO, B.; MASSALDI, H. Extraction of equine gonadotropin from pregnant mare plasma by adsorption on chromatographic media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 1, p. 22-25, 1998.

GOOS, H.; COLE, H. Further studies on the purification of mare gonadotropic hormone. **Endocrinology**, v. 26, p. 244-249, 1940.

GOSPODAROWICZ, D.; PAPKOFF, H. A simple method for the isolation of pregnant mare serum gonadotropin. **Endocrinology**, v. 80, p. 699-702, 1967.

GOSPODAROWICZ, D. Purification and physicochemical properties of the pregnant mare serum gonadotropin (PMSG). **Endocrinology**, v. 91, p. 101-106, 1972.

HAFEZ E. S. E. **Reprodução Animal**, 6. ed. , São Paulo: Manole, 1995.

HAGE D. S. Affinity Chromatography: A review of clinical applications. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 593-615, 1999.

LEGARDINIER, S.; CAHOREAU, C.; KLETT, D.; COMBARNOUS, Y. Involvement of equine chorionic gonadotropin (eCG) carbohydrate side chains in its bioactivity; lessons from recombinant hormone expressed in insect cells. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, p. 255-259, 2005.

LEGARDINIER, S.; POIRIER J. C.; KLETT, D.; COMBARNOUS, Y. Stability and biological activities of heterodimeric and single-chain equine LH/chorionic gonadotropin variants. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 40, p. 185-198, 2008.

LITTORIN, M.; WELINDER, H.; HULTBERG, B. Kidney function in stainless steel welders. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 53, n. 3, p. 279-82, 1984

MADUREIRA, E. H.; PIMENTEL, J. R. V.; ALMEIDA, A. B.; ROSSA, L. A. F. Sincronização com progestágenos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1º, 2004, Londrina, PR. **Anais...** Londrina, PR, p.117-128, 2004.

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R. Biochemical, biological, and immunological properties of chemically deglycosylated human choriogonadotropin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 12, p.7109-7115, 1982.

MCFARLANE, J. R.; CZEKALA, N. M.; PAPKOFF, H. Zebra chorionic gonadotropin: partial purification and characterization. **Biology of Reproduction**, v. 44, n. 5. p. 827-833, 1991.

MOORE JR, W. T.; WARD, D. N. Pregnant mare serum gonadotropin: rapid chromatographic procedures for the purification of intact hormone and isolation of subunits. **The Journal of Biological Chemistry.**, v. 255, p. 6923, 1980.

MURPHY, D. B.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 1, p. 27-44, 1991.

PARSON, T. F.; STRICKLAND, T. W.; PIERCE, J. G. Disassembly and assembly of glycoprotein hormone. **Methods in Enzymology**, v. 109, p. 736. 1981.

PIERCE, J. C.; PARSONS, T. F. Glycoprotein hormones: structure and function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 50, p. 465, 1981.

RAMACHANDRAN, J.; SAIRAM, M. R. The effects of interstitial cell-stimulating hormone its subunits and recombination, on isolated rat Leyding cell. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 67, p. 294-300, 1975.

ROSSA, L. A. F.; ALMEIDA, A. B.; BINELLI, M.; MAZZA, P. H.; GASPAR, P. S.; BERTAN, C. M.; BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H. Uso do eCG ou benzoato de estradiol associado ao norgestomet em vacas de corte no período pós-parto. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. X, p. X-XX, 2008.

Statistical Analysis System. **SAS user's guide**: statistics. 7. ed. Cary: NC, 2002.

SHETTIGAR, U. R.; REUL, H. Portable artificial kidney with advantages of hemodialysis, hemofiltration, and hemoperfusion. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 6, n. 1, p. 17-22, 1982

SOUMANO, K.; PRINCE, C. A. Ovarian follicular steroidogenic acute regulatory protein, low-density lipoprotein receptor and cytochrome P450 side-chain cleavage messenger ribonucleic acid in cattle undergoing superovulation. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 516-22, 1997.

SOUMANO, K.; SILVERSIDES, D. W.; DOIZÉ, F.; PRINCE, C. A. Follicular 3β -hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450 17α -hydroxylase and aromatase messenger ribonucleic acid in cattle undergoing superovulation. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1419-26, 1996.

STEWART, F.; ALLEN, W. R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 527-36, 1981.

SUGINO, H.; BOUSFIELD G. R.; MOORE, W. T.; WARD, D. N. Structural studies on glycoprotein equine hormones. Amino acid sequence of equine lutropin beta-subunit. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 18, p.8610-8620, 1987.

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review. **Theriogenology**, v. 54, p. 25-55, 2000.

VIRMANI, M.; GUPTA, A. K.; GARG, S. K. Extraction, purification and characterization of equine chorionic gonadotrophin (eCG) from pregnant mare's serum. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 73, n. 11, p. 1224-1228, 2003.

VOET, D; VOET, J.G.; **Biochemistry**. 2. ed. New York: Wiley an Sons, 1990. 158 p.

WOODING, F. B. P; MORGAN, G.; FOWDEN, A. L.; ALEEN, W.,R. A structural and immunological study of chorionic gonadotrophin production by equine trophoblast girdle and cup cells. **Placenta**, v. 22, p. 749-767, 2001.

APÊNDICE A - CURVAS DE CALIBRAÇÃO - MÉTODO DE BCA

1. Diafiltração do plasma com tampão Tris- HCl 0,1M, contendo NaCl 0,5M e NaN₃ 0,2%, pH 7,4

Concentração de globulina (ug/mL)	Absorbância (570nm)		
	Média	Duplicata 1	Duplicata 2
2,50	0,0080	-0,0020	0,0180
5,00	0,0280	0,0260	0,0300
10,00	0,0770	0,0790	0,0750
20,00	0,1930	0,1950	0,1910
40,00	0,3970	0,3950	0,3990

Quadro 7 - Média e duplicatas de absorbância e da concentração protéica do padrão de globulina do método de BCA, usadas para constituir a curva de calibração do Gráfico 5

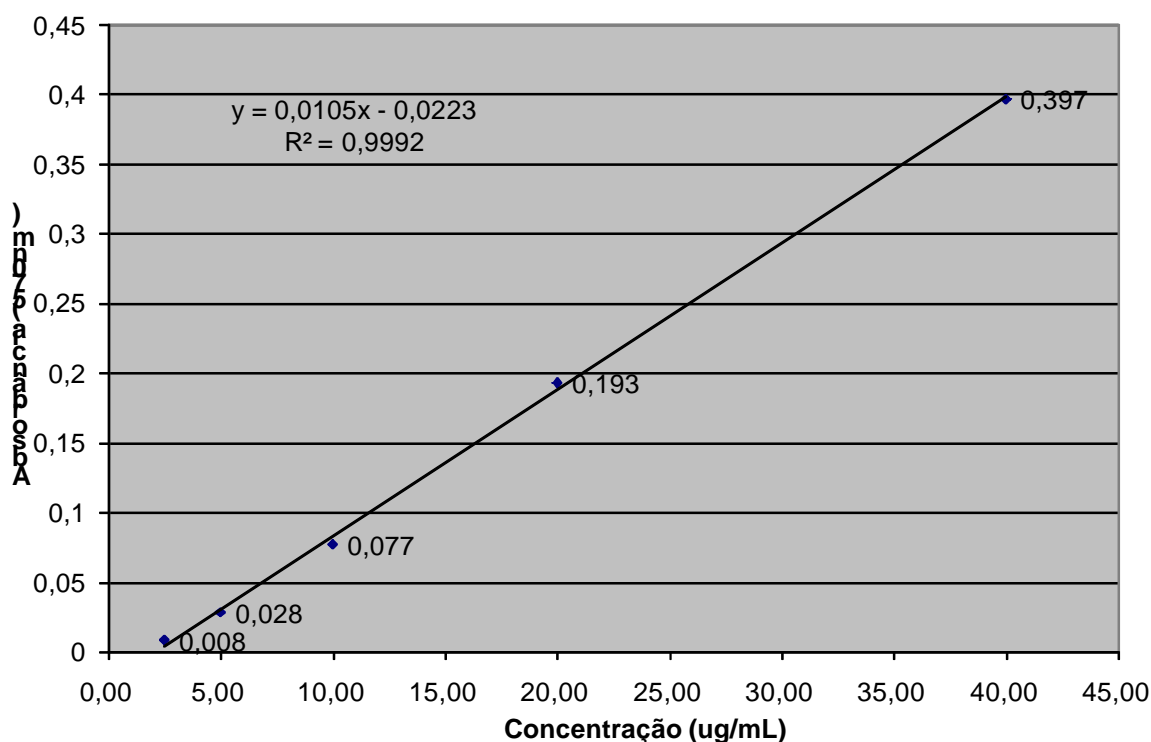


Gráfico 5 - Curva de calibração para quantificação de proteínas contidas no plasma (Antes da DF) e no plasma diafiltrado (Depois da DF), pelo método de BCA

2. Purificação do plasma por cromatografia de afinidade em coluna de Blue-Sepharose FF

Concentração de globulina (ug/mL)	Absorbância (570nm)		
	Média	Duplicata 1	Duplicata 2
2,50	0,0080	-0,0020	0,0180
5,00	0,0280	0,0260	0,0300
10,00	0,0770	0,0790	0,0750
20,00	0,1930	0,1950	0,1910
40,00	0,3970	0,3950	0,3990

Quadro 8 - Média e duplicatas de absorbância e da concentração protéica do padrão de globulina do método de BCA, usadas para constituir a curva de calibração do Gráfico 6

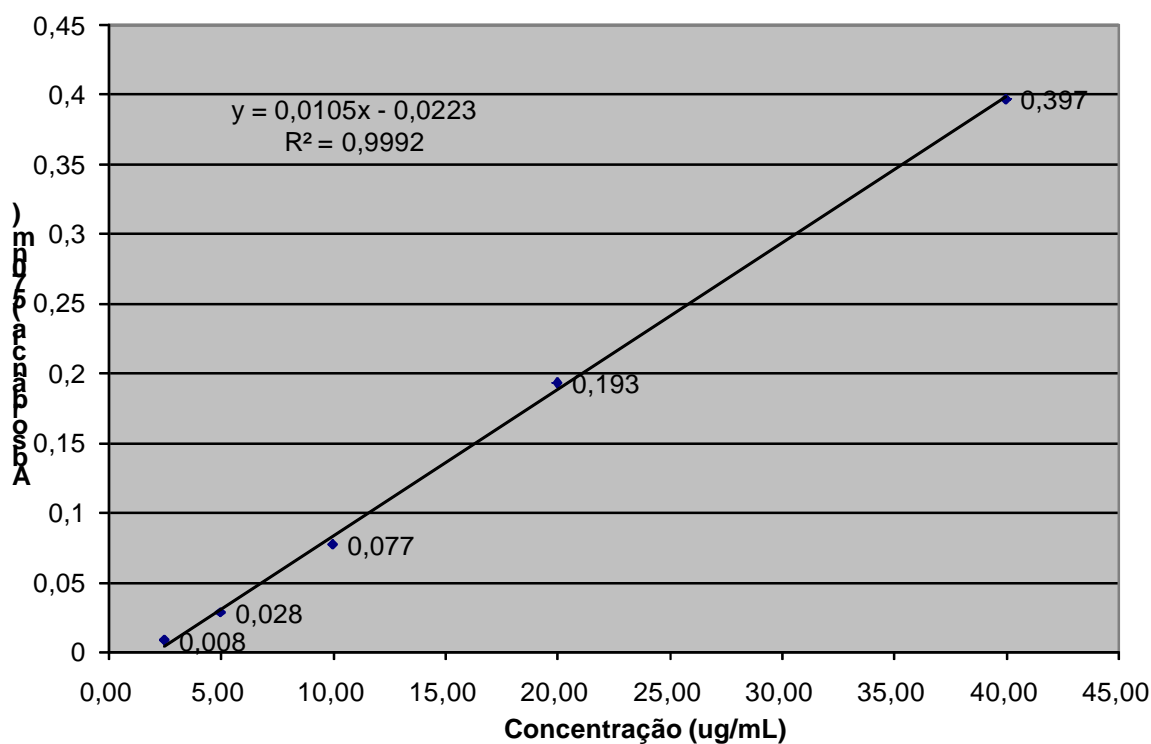


Gráfico 6 - Curva de calibração para quantificação de proteínas contidas no plasma (Plasma) e nas frações purificadas, obtidas da cromatografia de afinidade em coluna de Blue-Sepharose (Picos 1, 2, 3, e 4), pelo método de BCA

3 Purificação por cromatografia de afinidade com ConA-Sepharose 4B

3.1 Cromatografia das frações purificadas que adsorveram a Blue Sepharose FF

Concentração de globulina (ug/mL)	Absorbância (570nm)		
	Média	Duplicata 1	Duplicata 2
2,50	-0,0015	-0,0010	-0,0020
5,00	0,0100	0,0110	0,0090
10,00	0,0495	0,0490	0,0500
20,00	0,1425	0,1450	0,1400
40,00	0,3265	0,3290	0,3240

Quadro 9 - Média e duplicatas de absorbância e da concentração protéica do padrão de globulina do método de BCA, usadas para constituir a curva de calibração do Gráfico 7

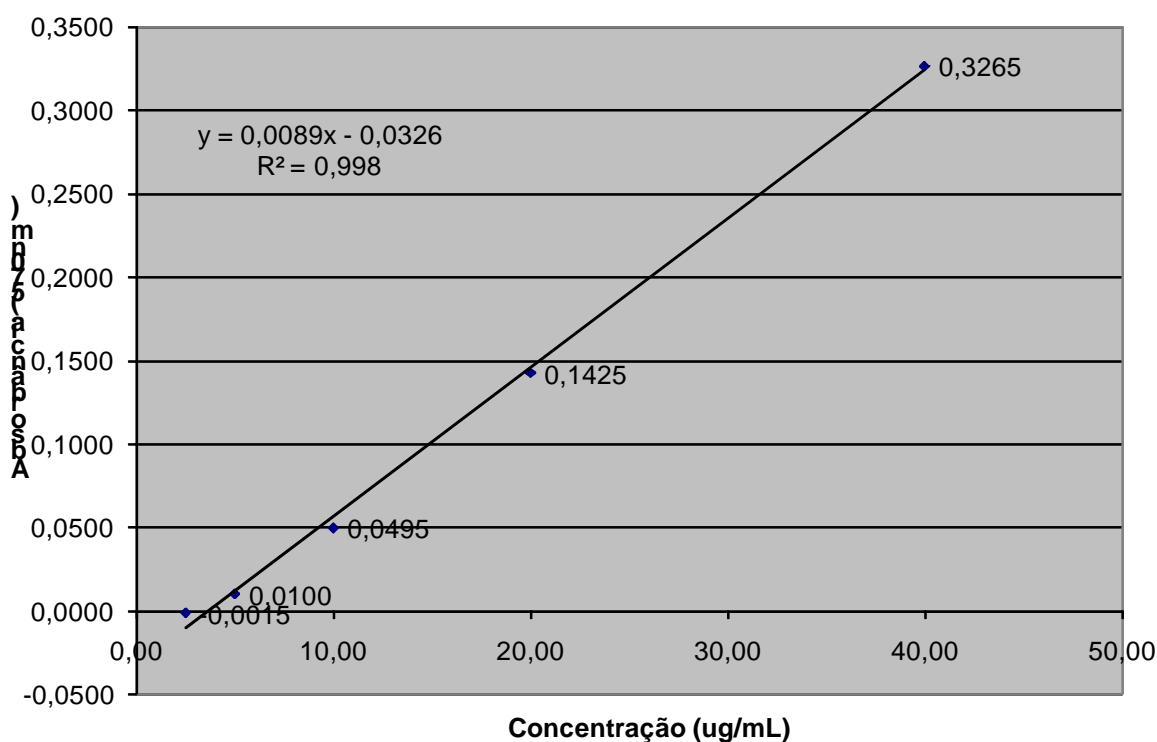


Gráfico 7 - Curva de calibração para quantificação de proteínas contidas na Amostra Aplicada 1 e nas frações purificadas, obtidas da cromatografia de afinidade em coluna de ConA-Sepharose 4B (Picos 1, 2 e 3), pelo método de BCA.

3.2 Cromatografia das frações purificadas que não adsorveram à Blue Sepharose FF

Concentração de globulina (ug/mL)	Absorbância (570nm)		
	Média	Duplicata 1	Duplicata 2
2,50	0,012	0,012	0,012
5,00	0,023	0,023	0,022
10,00	0,065	0,064	0,066
20,00	0,142	0,143	0,140
40,00	0,301	0,299	0,303

Quadro 10 - Média e duplicatas de absorbância e da concentração protéica do padrão de globulina do método de BCA, usadas para constituir a curva de calibração do Gráfico 8.

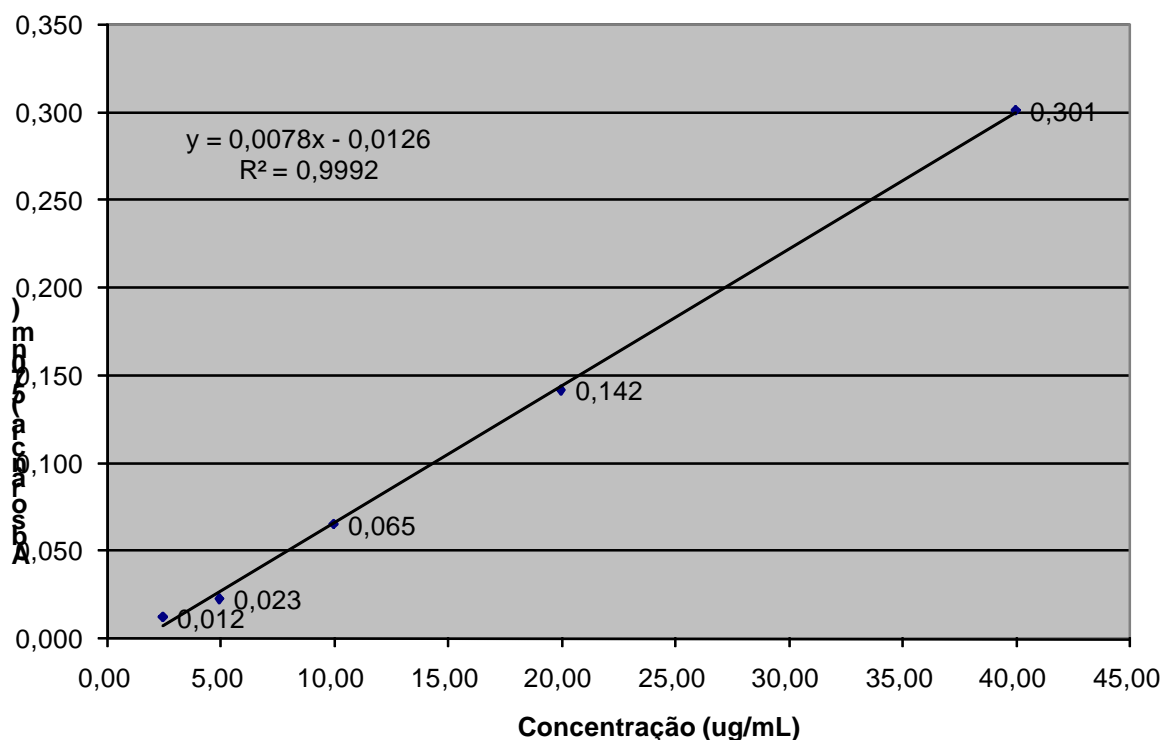


Gráfico 8 - Curva de calibração para quantificação de proteínas contidas na Amostra Aplicada 2 e nas frações purificadas, obtidas da cromatografia de afinidade em coluna de ConA-Sepharose 4B (Picos 1, 2 e 3), pelo método de BCA.

3.3 Cromatografia do plasma diafiltrado

Concentração de globulina (ug/mL)	Absorbância (570nm)		
	Média	Duplicata 1	Duplicata 2
2,50	-0,0015	-0,0010	-0,0020
5,00	0,0100	0,0110	0,0090
10,00	0,0495	0,0490	0,0500
20,00	0,1425	0,1450	0,1400
40,00	0,3265	0,3290	0,3240

Quadro 11 - Média e duplicatas de absorbância e da concentração protéica do padrão de globulina do método de BCA, usadas para constituir a curva de calibração do Gráfico 9.

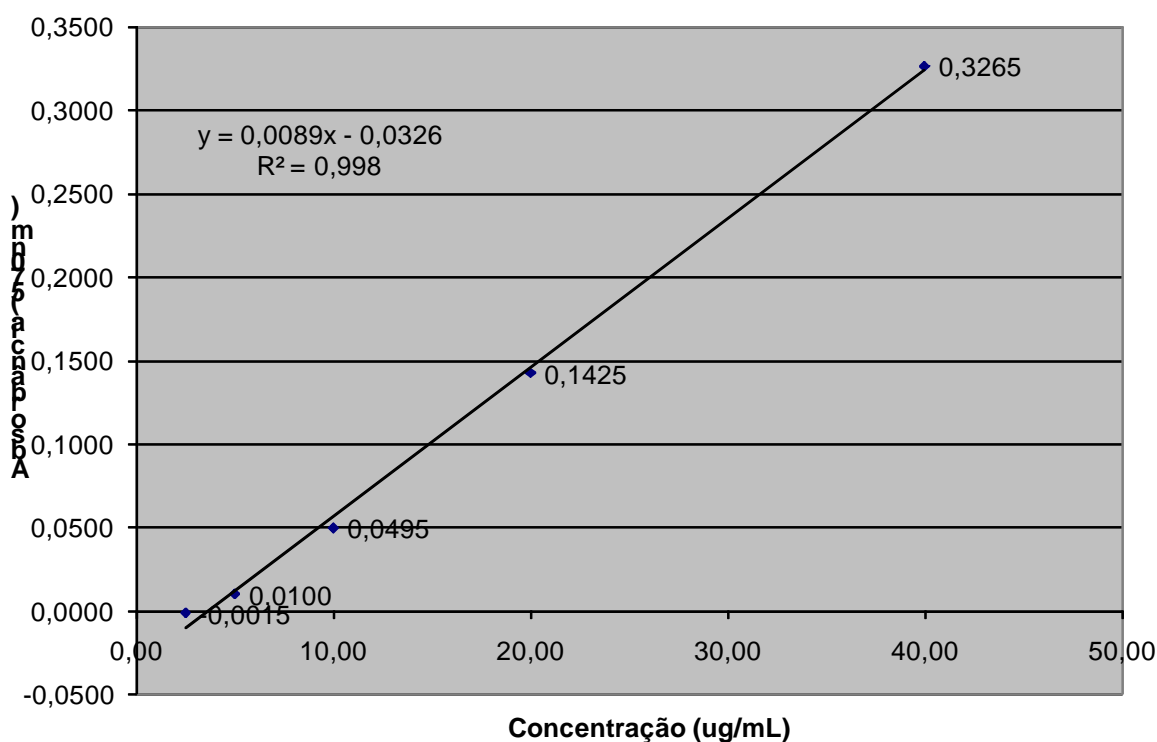


Gráfico 9 - Curva de calibração para quantificação de proteínas no plasma diafiltrado e nas frações purificadas, obtidas na cromatografia de afinidade em coluna de ConA-Sepharose 4B (Picos 1, 2 e 3), pelo método de BCA.

APÊNDICE B - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os valores dos pesos dos ovários normalizados pelo peso vivo dos animais (peso do ovário dividido pelo peso vivo do animal - Pov/PV), em miligramas, utilizados para a constituição da curva de calibração de atividade biológica de eCG; e a curva de calibração para o ensaio biológico de eCG encontram-se no Quadro 12 e no Gráfico 10, respectivamente.

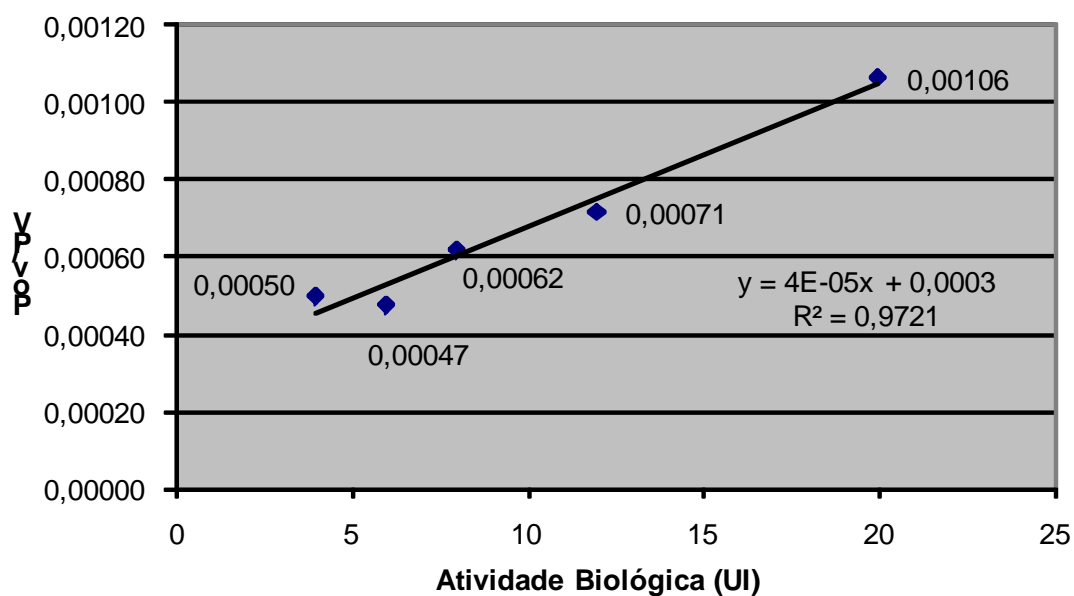


Gráfico 10 - Curva de calibração de eCG e valor de R^2 para quantificação de atividade biológica (UI), referente ao ensaio biológico em ratas impúberes

Atividade Biológica (UI)	Animal	Peso Vivo (g)	Peso Ovários (g)	Pov/PV
20UI	1	89,10	0,0829	0,00093
	13	85,78	0,0861	0,00100
	16	82,96	0,0994	0,00120
	17	92,13	0,0961	0,00104
	9	94,03	0,1063	0,00113
	Média	88,80	0,0942	0,00106
	DP	4,52	0,0096	0,00011
12UI	6	75,00	0,0670	0,00089
	2	82,30	0,0522	0,00063
	12	88,78	0,0533	0,00060
	7	94,44	0,0618	0,00065
	15	100,13	0,0790	0,00079
	Média	88,13	0,0627	0,00071
	DP	9,88	0,0110	0,00012
8UI	5	77,77	0,0483	0,00062
	24	83,58	0,0531	0,00064
	20	89,19	0,0600	0,00067
	21	99,01	0,0620	0,00063
	18	92,02	0,0481	0,00052
	11	79,52	0,0358	0,00045
	Média	86,85	0,0512	0,00061
	DP	7,55	0,0105	0,00009
6UI	11	79,52	0,0358	0,00045
	22	91,53	0,0380	0,00042
	4	88,50	0,0517	0,00058
	25	100,41	0,0465	0,00046
	19	92,87	0,0424	0,00046
	Média	90,57	0,0429	0,00047
	DP	7,57	0,0064	0,00006
4UI	23	78,84	0,0411	0,00052
	10	88,88	0,0484	0,00054
	14	97,67	0,0470	0,00048
	3	88,92	0,0426	0,00048
	8	94,61	0,0430	0,00045
	Média	89,78	0,0444	0,00049
	DP	7,19	0,0031	0,00004

Quadro 12 - Relação dos animais utilizados para a obtenção da curva de calibração de eCG, com seus respectivos pesos vivos, pesos de seus ovários e peso ovariano corrigido pelo peso vivo (Pov/PV), médias e desvio padrão (DP) da Pov/PV

APÊNDICE C - RESULTADOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA NAS DIFERENTES AMOSTRAS DE PLASMA, E DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DOS DIFERENTES PROCESSOS CROMATOGRÁFICOS

Atividade biológica, relação dos animais utilizados, respectivos valores de pesos (antes da eutanásia), pesos de seus ovários, peso ovariano corrigido pelo peso vivo (Pov/PV), médias e desvio padrão (DP), do ensaio biológico com ratas impúberes, nas amostras obtidas no plasma, no plasma diafiltrado e nas frações purificadas de cada processo cromatográfico, estão apresentados nos quadros 13, 14, 15 e 16.

Amostras	Animal	Peso Vivo g	Ovário g	Ovário/PV	Atividade Biológica UI/mL
Plasma	1	92,12	0,036	0,00039	3,63
	10	89,65	0,0547	0,00061	
	11	102,68	0,0333	0,00032	
	14	75,66	0,0422	0,00056	
	25	95,44	0,0532	0,00056	
	Média	91,11	0,0439	0,00048	
	DP	9,93	0,0098	0,00012	
Diafiltrado	4	90	0,0441	0,00049	5,14
	12	101,78	0,0555	0,00055	
	13	85,7	0,0455	0,00053	
	15	91,23	0,0468	0,00051	
	26	84,33	0,0605	0,00072	
	Média	90,61	0,0505	0,00056	
	DP	6,88	0,0072	0,00009	

Quadro 13 - Ensaio biológico da diafiltração do plasma com tampão Tris- HCl 0,1M, contendo NaCl 0,5m e NaN₃ 0,2%, pH 7,4

Amostras	Animal	Peso Vivo g	Ovário g	Ovário/PV	Atividade Biológica UI/mL
Aplicada I	1	92,12	0,0360	0,00039	3,63
	10	89,65	0,0547	0,00061	
	11	102,68	0,0333	0,00032	
	14	75,66	0,0422	0,00056	
	25	95,44	0,0532	0,00056	
	Média	91,11	0,0439	0,00048	
DP	9,93	0,0098	0,00012		
Pico 1 e 3	7	102,6	0,0303	0,00030	1,16
	6	87,37	0,0363	0,00042	
	Média	94,99	0,0333	0,00035	
	DP	38,08	0,0164	0,00017	
Pico 2 e 4	21	93,15	0,0404	0,00043	3,50
	19	95,19	0,0437	0,00046	
	3	90,87	0,0406	0,00045	
	Média	93,07	0,0416	0,00045	
	DP	24,87	0,0110	0,00012	

Quadro 14 - Ensaio biológico da purificação do plasma por cromatografia de afinidade em coluna de Blue-Sepharose FF

Amostras	Animal	Peso Vivo g	Ovário g	Ovário/PV	Atividade Biológica UI/mL
Aplicada 1	21	93,15	0,0404	0,00043	3,50
	19	95,19	0,0437	0,00046	
	3	90,87	0,0406	0,00045	
	Média	93,07	0,0416	0,00045	
	DP	2,16	0,0019	0,00001	
Pico 2	2	97,52	0,0274	0,00028	-0,38
Pico 3	14	90,00	0,0429	0,00048	3,65
	16	94,65	0,0462	0,00049	
	Média	92,33	0,0446	0,00048	
	DP	3,29	0,0023	0,00001	
Pico 3 concentrado com membrana 10 kDa de corte	1	99,90	0,0460	0,00046	2,59
	4	93,40	0,0500	0,00054	
	20	98,40	0,0440	0,00045	
	18	94,10	0,0260	0,00028	
	11	83,50	0,0300	0,00036	
	Média	93,86	0,0392	0,00042	
	DP	6,42	0,0105	0,00010	
Pico 3 concentrado com membrana 3kDa de corte	13	87,10	0,0300	0,00034	1,17
	5	104,10	0,0480	0,00046	
	12	95,70	0,0360	0,00038	
	17	88,70	0,0230	0,00026	
	6	82,10	0,0270	0,00033	
	Média	91,54	0,0328	0,00036	
	DP	8,54	0,0097	0,00007	

Quadro 15 - Ensaio biológico da cromatografia de afinidade em coluna de ConA-Sepharose 4B com as frações purificadas que adsorveram a Blue Sepharose FF

Amostras	Animal	Peso Vivo g	Ovário g	Ovário/PV	Atividade Biológica UI/mL
Aplicada 2	1	92,12	0,0360	0,00039	3,63
	10	89,65	0,0547	0,00061	
	11	102,68	0,0333	0,00032	
	14	75,66	0,0422	0,00056	
	25	95,44	0,0532	0,00056	
	Média	91,11	0,0439	0,00048	
DP	9,93	0,0098	0,00012		
Pico 1	20	87,31	0,0355	0,00041	2,99
	8	94,26	0,0472	0,00050	
	9	94,37	0,0360	0,00038	
	Média	91,98	0,0396	0,00043	
DP	4,04	0,0066	0,00006		
Pico 2	16	83,68	0,0294	0,00035	1,25
	18	93,02	0,0298	0,00032	
	5	81,90	0,0314	0,00038	
	Média	86,20	0,0302	0,00035	
DP	5,97	0,0011	0,00003		
Pico 3 concentrado com membrana 10 kDa de corte	2	91,90	0,0410	0,00045	1,55
	13	89,30	0,0360	0,00040	
	15	88,20	0,0320	0,00036	
	7	98,90	0,0350	0,00035	
	23	89,90	0,0290	0,00032	
	Média	91,64	0,0346	0,00038	
DP	4,28	0,0045	0,00005		
Pico 3 concentrado com membrana 3kDa de corte	20	98,70	0,0270	0,00027	0,31
	3	91,20	0,0310	0,00034	
	4	91,80	0,0310	0,00034	
	22	88,30	0,0270	0,00031	
	21	95,90	0,0310	0,00032	
	24	84,60	0,0310	0,00037	
	Média	93,18	0,0294	0,00032	
DP	4,21	0,0018	0,00002		

Quadro 16 - Ensaio biológico da cromatografia de afinidade em coluna de ConA-Sepharose 4B com a plasma diafiltrado.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)