

# OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM PARA CARACTERIZAR OLIGÔMEROS DE A $\beta$ : POTENCIAL USO NA TRIAGEM DE NOVOS FÁRMACOS

Alessandra Amaral de Vasconcellos<sup>1</sup>, Diogo Onofre de Souza<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Biomedicina, UFRGS <sup>2</sup>Orientador, Departamento de Bioquímica UFRGS

## Introdução e Objetivo:

- Disfunção no metabolismo da proteína beta-amiloide (A $\beta$ ) início dos processos neurodegenerativos da Doença de Alzheimer (DA).
- Evidências apontam a conformação solúvel e oligomérica da A $\beta$  (A $\beta$ Os), prévia à formação das placas, como grande pivô e desencadeadora dos primeiros eventos tóxicos na DA.
- Os A $\beta$ Os podem ser classificados de acordo com sua massa molecular: baixa massa molecular (BMM ~13.5 kDa) e alta massa molecular (AMM ~56 kDa).
- Identificação e caracterização das espécies de A $\beta$ Os: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à uma coluna de exclusão molecular (EM).

parâmetros físico-químicos devem ser rigidamente controlados para obter alta resolução nos picos de fluorescência.

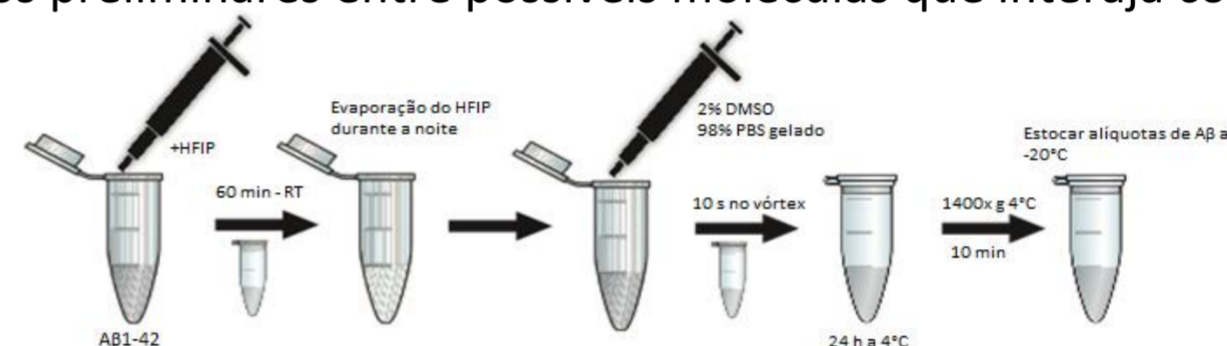
**OBJETIVO:** otimizar as condições para caracterização dos A $\beta$ Os por CLAE-EM validando esta técnica como uma nova plataforma experimental para identificação de novas moléculas, potenciais fármacos, que interajam com os A $\beta$ Os.

## Métodos:

A caracterização dos A $\beta$ Os foi realizada por CLAE-EM acoplado a detector de fluorescência, de modo a monitorar a resolução dos picos. Para otimização da técnica realizou-se dois desenhos experimentais:

- 1) avaliou-se a concentração de fosfato de sódio e cloreto de sódio na fase móvel;
- 2) avaliou-se o pH da fase móvel, temperatura da coluna e fluxo.

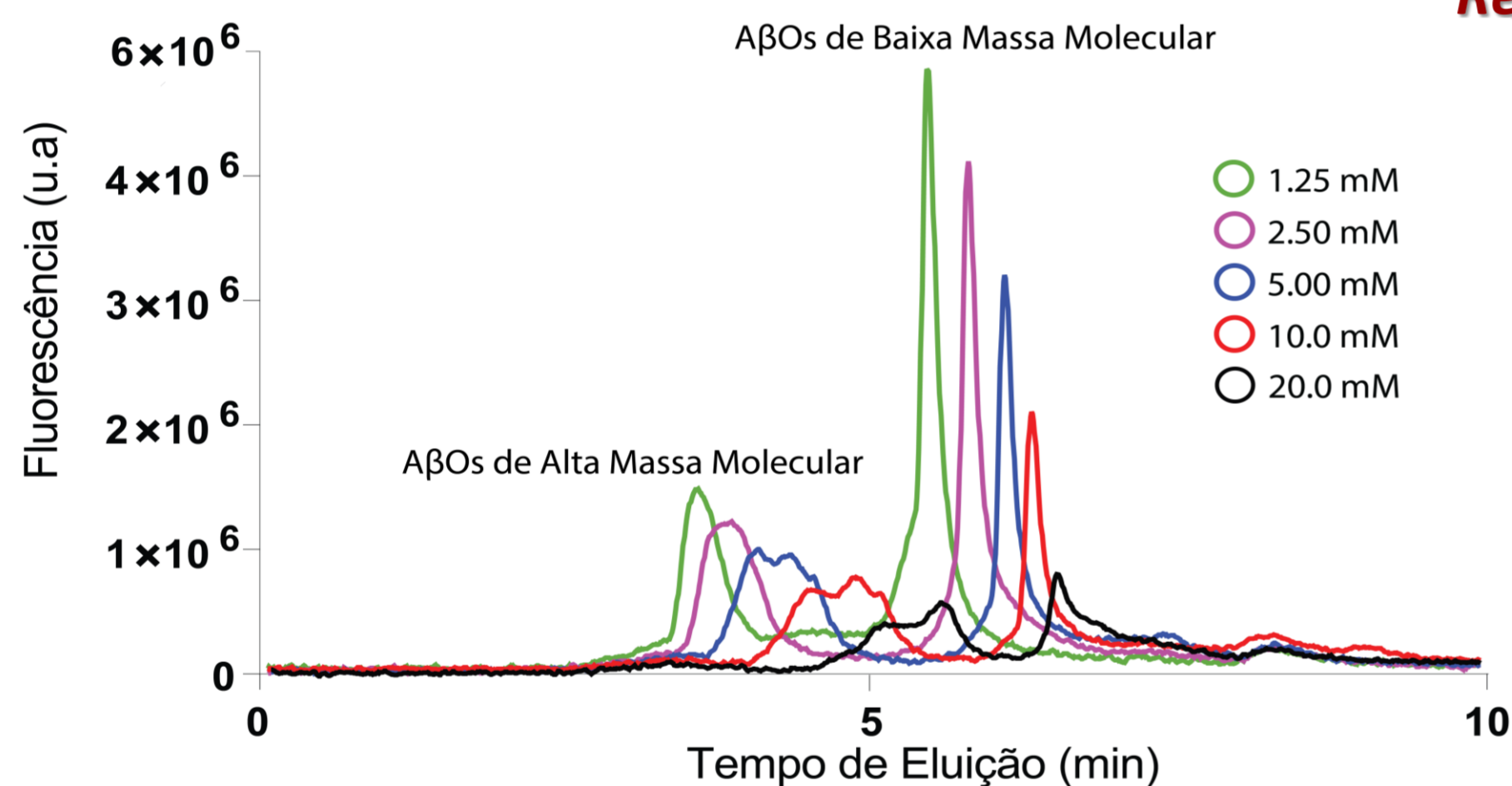
Posteriormente, buscou-se validar a técnica de acordo com os seguintes parâmetros: linearidade, precisão, estabilidade e limites de quantificação e detecção. Após, realizou-se ensaios preliminares entre possíveis moléculas que interaja com os A $\beta$ Os.



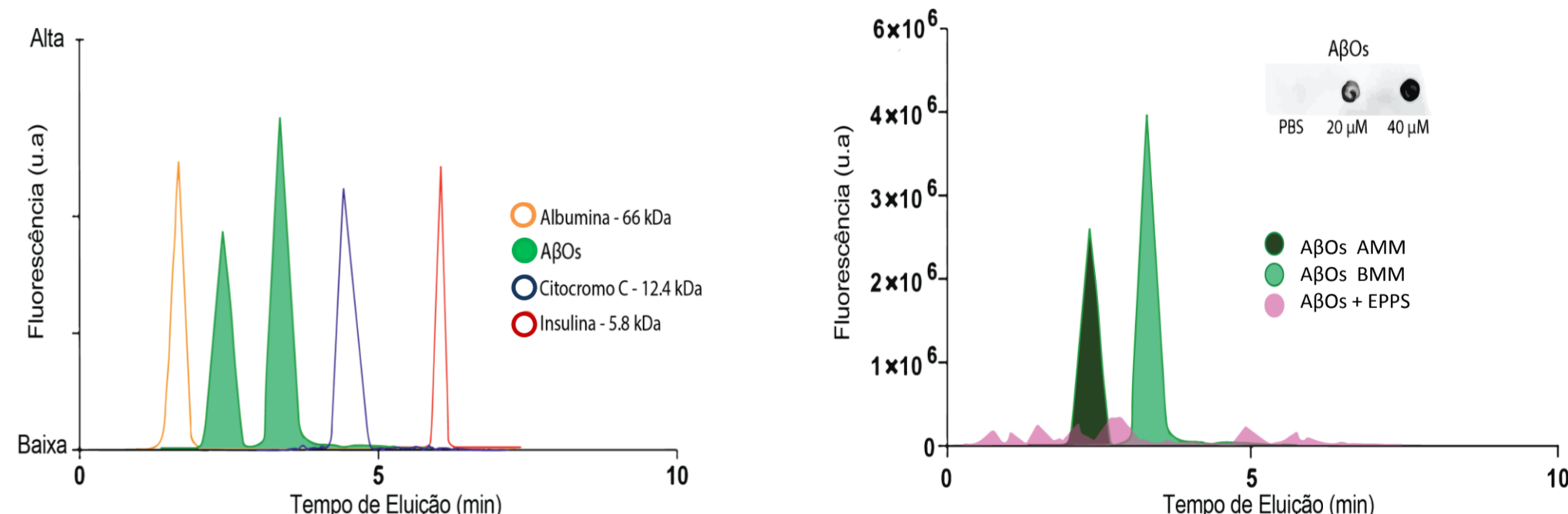
Lambert et al. 1998

**Figura 1: Preparação de A $\beta$ Os.** A $\beta$  em sua conformação monomérica é obtido através da solubilização do peptídeo A $\beta$  em HFIP. O solvente evapora formando um filme transparente. Após, esse filme é solubilizado em DMSO (2%) e diluído para 100  $\mu$ M em PBS, e segue-se incubação por 24 horas a 4 °C.

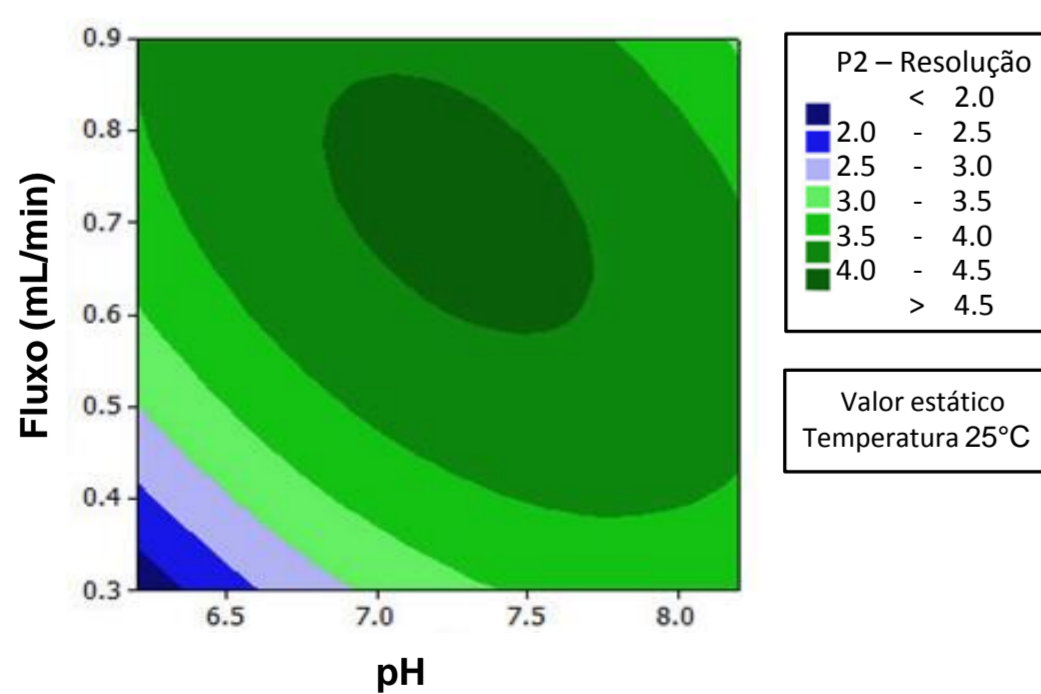
## Resultados:



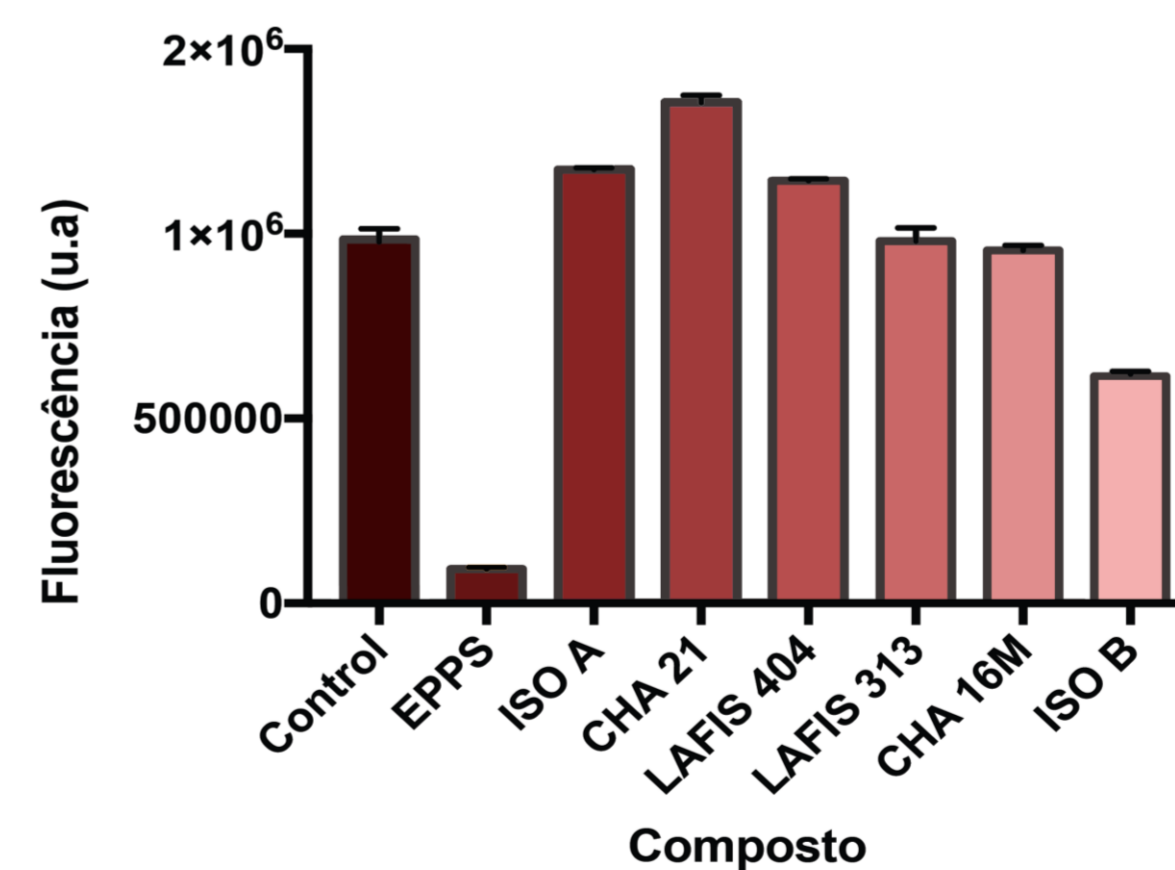
**Figura 2: Influência da concentração do fosfato de sódio na fase móvel nos picos de A $\beta$ Os.** O aumento da concentração de fosfato de sódio na fase móvel afeta diretamente a resolução dos picos de A $\beta$ Os. Ao comparar os extremos (picos de cor verde e preto), pode-se assegurar que a menor concentração do fosfato de sódio favorece a separação e resolução dos picos de A $\beta$ Os. Desta forma, definimos que 1,25 mM como sendo a concentração de fosfato de sódio ótima para a fase móvel deste experimento.



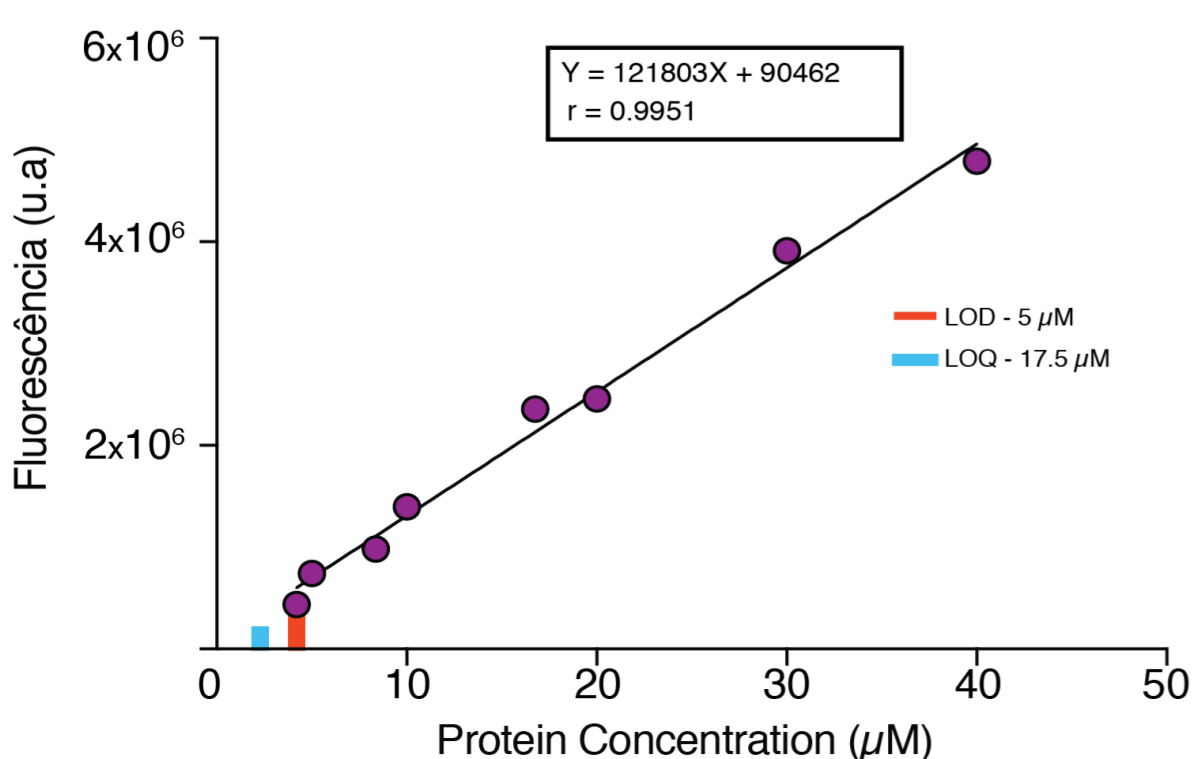
**Figura 5: Cromatograma representativo para estimar a massa molecular (MM) no CLAE-EM e efeito do EPPS no oligômeros.** A) A $\beta$ Os estão representados por dois picos de cor verde 1) pico da esquerda: pico de alta massa molecular (AMM) com ~ 56 kDa; 2) pico da direita: pico de baixa massa molecular (BMM) com ~ 17 kDa. B) Cromatograma do perfil dos A $\beta$ Os após desafio com EPPS; teste Dot-blot com anticorpo de A $\beta$ Os. Picos de AMM e BMM de A $\beta$ Os (20  $\mu$ M) desaparecem na presença de EPPS (20 mM - 24h).



**Figura 3: Influência do pH da fase móvel, temperatura da coluna e do fluxo na resolução dos picos de A $\beta$ Os.** Countour Plot de P2 - Resolução Vs Fluxo (mL/min) Vs pH. A temperatura da coluna não influenciou consideravelmente a resolução dos picos, sendo assim, estabeleceu-se arbitrariamente a temperatura ótima de 25°C (temperatura ambiente). O fluxo alterou o tempo de eluição e a resolução dos picos, apresentando os melhores resultados no intervalo entre 0,6 e 0,85 mL/min. O pH teve maior influência na resolução dos picos, com melhores resultados entre 7,0 e 7,5.



**Figura 6: Representação gráfica da soma dos picos de AMM e BMM de A $\beta$ Os (25  $\mu$ M) na presença ou ausência de moléculas candidatas.** O tratamento de A $\beta$ Os com EPPS gerou uma grande diminuição nos picos de fluorescência. Os novos compostos ISO A, CHA 21, LAFIS 404, LAFIS 313 e CHA 16M não afetam nos picos de A $\beta$ Os. Em contraposição, o composto ISO B diminuiu em 40% as somas das áreas dos picos de A $\beta$ Os.



**Figura 4: Correlação linear entre a concentração de A $\beta$ Os e fluorescência dos picos no CLAE-EM.** Encontrou-se uma correlação linear positiva entre a concentração de A $\beta$ Os e a fluorescência dos picos no CLAE-EM resultando num coeficiente de correlação (r) de 0,9951. Com base nos cromatogramas obtidos, o limite de quantificação (LDQ) e o limite de detecção (LDD) foram definidos como 4,2 $\mu$ M e 2,1 $\mu$ M, respectivamente.

## Conclusão:

Através da otimização do método CLAE-EM para caracterização dos A $\beta$ Os, determinou-se que a resolução dos picos é altamente dependente da concentração de cloreto de sódio, fosfato de sódio e pH da fase móvel. Mediante a validação da técnica aplicada para a detecção de A $\beta$ Os no CLAE-EM, observou-se que é possível aplicar esta técnica na triagem e identificação de moléculas que interajam com os A $\beta$ Os, constituindo possíveis candidatos a fármacos que possam ser utilizados em estudos experimentais com modelos da DA com alto potencial translacional.