

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM PARA CARACTERIZAR OLIGÔMEROS DE AB: POTENCIAL USO NA TRIAGEM DE NOVOS FÁRMACOS

Alessandra Vasconcellos¹, Igor Fontana², Andréia Rocha³, Grace Gosmann³, Aline Zimmer⁴, Diogo Souza⁵, Diogo Miron⁶ e Eduardo Zimmer⁷

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

Introdução: A Doença de Alzheimer (DA) é uma das principais causas de demência mundialmente. Atualmente, acredita-se que uma conformação solúvel e oligomérica da proteína beta amiloide (A β Os) possa ser o primeiro evento tóxico na DA, classificando-as em baixa (~13.5kDa) e alta massa molecular (~56kDa). A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acoplada à uma coluna de exclusão molecular (EM), parece ser uma metodologia promissora para caracterizar os A β Os. O objetivo deste trabalho foi otimizar e validar esta técnica como uma nova plataforma experimental para avaliação de potenciais fármacos que interajam com os A β Os.

Métodos: Os A β Os foram obtidos de acordo com o método previamente proposto (PNAS, 26;95(11):6448-53). A caracterização foi realizada por CLAE-EM acoplado a detector de fluorescência, para monitorar a resolução dos picos. Foram realizados dois desenhos experimentais: 1) concentração de fosfato de sódio e NaCl na fase móvel; 2) pH da fase móvel, temperatura da coluna e fluxo. Linearidade, precisão, estabilidade e limites de quantificação e detecção foram avaliados. Após, realizou-se ensaios preliminares de interação entre designadas moléculas e A β Os.

Resultados: Obteve-se maior resolução nos picos de A β Os sem NaCl e com baixas concentrações de fosfato de sódio (<3mM) na fase móvel. A temperatura da coluna não influenciou. Conforme estes parâmetros, realizou-se a validação do método, obtendo-se linearidade (R²=0.9979), precisão (RSD<15%), estabilidade e limites de quantificação e detecção (17.5/5 μ M), respectivamente. Preliminarmente, observou-se que é possível aplicar o método CLAE-EM para avaliar a interação entre potenciais moléculas e A β Os.

Conclusão: Através da otimização do método CLAE-EM para caracterização dos A β Os, determinou-se que a resolução dos picos é dependente da concentração de NaCl, fosfato de sódio e pH da fase móvel. Através da validação da técnica, observou-se que é possível aplicá-la na triagem de novos candidatos a fármacos que interajam com os A β Os, demonstrando assim alto potencial translacional.

Apoio financeiro: CAPES [88881.141186/2017-01], CNPq [460172/2014-0], PRONEX, FAPERGS/CNPq [16/2551-0000475-7], INCT – Doenças cerebrais, excitotoxicidade e neuroproteção [465671/2014-4], FAPERGS/MS/CNPq/SESRS– PPSUS [30786.434.24734.23112017]