

CONJUGADO INFlixIMABE-PEROXIDASE DE SOJA COMO FERRAMENTA PARA FINS DE DIAGNÓSTICO

Luna Silvestri Souto¹, Anderson Albino Gomes², Lina Maria Salazar Echeverri³, Gustavo Felipe da Silva⁴

¹ Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária - CAV - bolsista PROBIC.

² Mestrando do programa de Pós-graduação em Biologia Molecular –CAV.

³ Doutoranda do programa de Pós-graduação em Biologia Molecular –CAV.

⁴ Orientador, Departamento da Engenharia Florestal – CAV – gustavo.silva@udesc.br

Palavras-chave: Peroxidase da soja, Infliximabe, Doença de Crohn

O objetivo do projeto consiste na criação de um kit diagnóstico, constituído de um anticorpo comercial terapêutico denominado Infliximabe (IFX). IFX é um dos mais eficazes medicamentos para a Doença de Crohn, uma grave doença inflamatória intestinal. O IFX reconhece com afinidade e especificidade o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), uma citocina chave na manutenção da inflamação e responsável pela disfunção inflamatória intestinal observada em pacientes acometidos pela doença de Crohn. Neste estudo faremos a ligação do IFX a enzima peroxidase da soja (SBP). Esta enzima é capaz de oxidar o substrato TMB, e serve como sistema sinalizador em imunoensaaios diagnósticos conhecidos como ELISA. Portanto, esta molécula formada pelo IFX e SBP será um componente essencial para um kit diagnóstico quantitativo do anticorpo terapêutico IFX em pacientes com doença de Crohn tratados. Este monitoramento, a partir deste kit, é essencial para o ajuste fino do tratamento destes pacientes com este medicamento extremamente caro. Mundialmente, a peroxidase mais utilizada em imunoensaaios é a peroxidase de raiz forte (HRP), a qual é majoritariamente importada a preços elevados pelas empresas produtoras de kits diagnósticos no país. Por outro lado, no Brasil, a soja é um dos mais abundantes produtos do agronegócio, porém sua casca não tem nenhum valor agregado substancial. No entanto, vários estudos demonstraram a presença na casca da soja de uma peroxidase com atividades equivalentes e até mesmo superiores a HRP. Como início de nosso projeto, fizemos a extração de cascas de sojas com atividades positivas para SBP, utilizando como detector de atividade o substrato TMB. Em sojas positivas para SBP, ocorre a rápida formação de coloração azul no reagente inicialmente incolor. A partir de cultivares positivas, a casca foi extraída manualmente e posteriormente fizemos a extração a frio em tampão Tris Base, pH 7.6 deixado sob agitação em temperatura ambiente – por 2 horas. Após esse tempo, o conteúdo foi filtrado, descartando as cascas e deixando apenas o líquido. Este, é levado para centrifugação por 15 minutos a 18000 rpm para a retirada de pequenas partículas. Após a centrifugação, o precipitado é descartado, o líquido então é filtrado afim de ser purificado em equipamento de cromatografia Äkta™ pure. A metodologia utilizada para purificação foi cromatografia por troca iônica, que consiste na imobilização da enzima SBP por atração de cargas opostas da coluna em relação as cargas dos aminoácidos da enzima. Posteriormente a imobilização, a liberação de frações distintas das proteínas imobilizadas são feitos com diferentes concentrações de NaCl. Após diversos procedimentos variando a quantidade e a forma como a amostra e os tampões eram aplicados, conseguiu-se a padronização da purificação. A amostra purificada foi concentrada em coluna de concentração Amicon, utilizando centrifugação a 4500 g por 15 minutos. Após a concentração foi realizada a quantificação de proteína com um Espectrofotômetro, aplicando 1 microlitro da amostra concentrada. A amostra purificada e concentrada foi aplicada também na eletroforese em gel de poliacrilamida com a finalidade de comprovar a presença da peroxidase na amostra, bem como sua pureza e atividade. Após a aplicação do gel com marcador de peso molecular pôde-se ver a

peroxidase com tamanho de aproximadamente 44 kDa, aparecendo purificada no gel. Com a purificação da enzima o próximo passo a ser feito é a biotinilação da peroxidase purificada. A biotina é uma vitamina que pode ser conjugada com outras proteínas sem alterar significativamente sua atividade. Esse processo é a chave para a associação entre o Infliximabe e a SBP através da estreptavidina, a qual se liga fortemente a molécula de biotina.

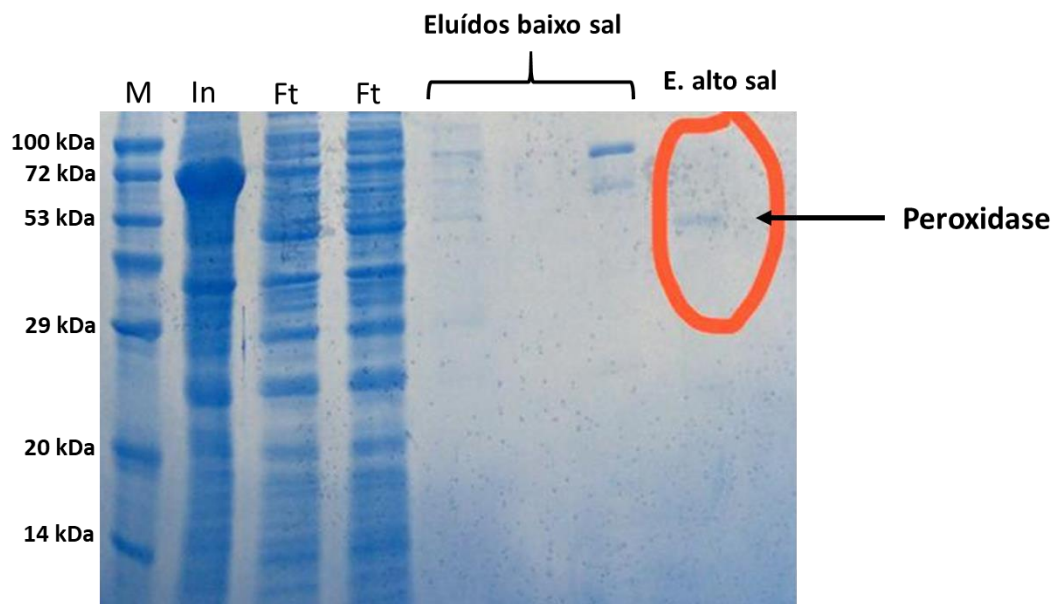


Fig. 1 Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando a purificação da proteína.