

SOLUÇÕES PARA ESTABILIZAÇÃO E ESTOCAGEM DE PROTEÍNAS ¹

Mariana Fuchs Goedel ², Maria de Lourdes Borba Magalhães ³ Bárbara Wosniak ⁴, Leonardo Antônio Fernandes ⁵

¹ Vinculado ao projeto “Desenvolvimento de ferramentas moleculares para detecção e purificação de anticorpos primários”.

² Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV – Bolsista PIBITI/CNPq.

³ Orientadora, Departamento de Produção Animal e Alimentos – CAV – maria.magalhaes@udesc.br

⁴ Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – CAV.

⁵ Graduado no Curso de Medicina Veterinária – CAV.

A proteína TRIM21-estreptavidina é uma proteína quimérica desenvolvida no laboratório de bioquímica do curso de Medicina Veterinária da Universidade do Estado de Santa Catarina, produzida em bactérias, que tem a capacidade de detecção de imunoglobulinas do tipo G de várias espécies de mamíferos. Tal proteína foi criada como substituição de anticorpos secundários para uso em imunoenaios. No entanto, a proteína não se mostra estável para estocagem por longos períodos, o que inviabilizaria seu uso como insumo em testes de imunodiagnósticos. Dessa forma, o presente projeto objetiva o estudo de uma formulação estabilizadora para a proteína TRIM21-estreptavidina para viabilizar seu uso como reagente de imunodiagnósticos animal.

A adição de solutos estabilizantes a proteínas é um meio muito aplicado a fim de protegê-las durante a preparação e o armazenamento. Solutos como açúcares, aminoácidos, metilaminas e sais liotrópicos têm a capacidade de proteger proteínas do processo de congelamento e descongelamento, que pode ser usado para estocar tais moléculas.

Os estabilizadores de proteína usados em soluções aquosas apresentam diversas classes químicas, porém, um único mecanismo universal pode explicar a estabilização. Ele afirma que a presença desses solutos em solução cria uma situação termodinamicamente desfavorável porque o potencial químico tanto da proteína quanto do aditivo é aumentado e as moléculas do soluto são preferencialmente excluídas do contato com a superfície da proteína.

Proteínas são estabilizadas porque desnaturação e dissociação, respectivamente, levariam a uma maior superfície de contato entre a proteína e o solvente e, portanto, aumentariam este efeito termodinamicamente desfavorável.

Baseando-se em um estudo realizado com a enzima fosfofrutoquinase (PFK), no qual descobriu-se que um amplo espectro de compostos fornece crioproteção para PFK, paralela à observações anteriores sobre proteínas estabilizadas em solução aquosa não congelada, pode-se considerar que tais premissas poderiam ser aplicadas a proteína TRIM21-estreptavidina.

Segundo os resultados do estudo citado acima, eles sugerem que o mesmo mecanismo para estabilização induzida por soluto descrita para sistemas aquosos pode ser operatório durante o processo de congelamento-descongelamento.

Tal estudo também determinou a capacidade de 28 compostos, que são conhecidos por serem preferencialmente excluídos da superfície das proteínas, para proteger a lactato desidrogenase (LDR) durante o congelamento-descongelamento. Os resultados sintetizados

deses experimentos podem ser observados na Tabela 1. A partir disso, percebe-se que quase todos os compostos testados forneceram algum grau de criopreservação.

A metodologia utilizada seria a realização de testes com possíveis solutos que estabilizariam a proteína TRIM21-estreptavidina tanto em solução aquosa, quanto congelada e descongelada. O protocolo para ambas as situações seria o mesmo, utilizando amostras da proteína em questão, adicionadas a um meio aquoso contendo os solutos e concentrações citados na Tabela 2.

Foram selecionados os cinco solutos com maior porcentagem de atividade recuperada da lactato desidrogenase, para que fossem testadas na estabilização da TRIM21-estreptavidina.

Depois da preparação das duas soluções, uma seria deixada em temperatura ambiente e a outra seria submetida a um processo de congelamento-descongelamento. Após uma semana, seriam realizados testes para verificar se a TRIM21-estreptavidina permanece reconhecendo IgG em ensaios de ELISA em ambas as situações.

Devido a pandemia de COVID 19, os testes não puderam ser realizados.

É importante ressaltar que as contribuições relativas dependem das propriedades químicas do soluto, bem como as propriedades de superfície da proteína, portanto, seriam necessários testes com a proteína TRIM21-estreptavidina para comprovar quais solutos, de fato, seriam eficientes para sua estabilização.

Tabela 1. *Atividade da lactato desidrogenase recuperada após congelamento e descongelamento na presença de solutos que se sabe que são preferencialmente excluídos de proteínas.*

Soluto	Concentração M	% atividade recuperada
Nenhum	0	21,5
Sacarose	1,5	85,4
Lactose	0,5	74,2
Sorbitol	1,0	75,3
2-metil-2,4-pentanodiol	1,0	97,0
Polietilenoglicol	1,0	100,0
Prolina	2,0	78,6
Na Glutamato	2,0	75,0
Lisina-HCl	2,0	85,4
Ácido γ -aminobutírico	1,0	76,9
Acetato de sódio	2,0	81,2

Fonte: John F. Carpenter (1990)

Tabela 2. *Solutos utilizados para teste de estabilização da proteína TRIM21-estreptavidina.*

Soluto	Concentração M
Sacarose	1,5
2-metil-2,4-pentanodiol	1,0
Polietilenoglicol	1,0
Lisina HCl	2,0
Acetato de sódio	2,0

Fonte: Mariana Fuchs Goedel (2020)

Palavras-chave: TRIM21-estreptavidina Soluções aquosas. Congelamento-descongelamento.