

DESENVOLVIMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA RETINOPATIA

Victor Fideles Cardoso

Angy Liseth Davalos

Ricardo José Giordano

Universidade de São Paulo

giordano@usp.br

Objetivos

A partir deste trabalho buscou-se aprofundar, a partir da expressão, análise e caracterização do VEGFA, os mecanismos de interação moleculares desta proteína com seus receptores, a fim de permitir o desenvolvimento de ferramentas que inibam com maior precisão e seletividade as vias de sinalização da angiogênese exacerbadas em processos patológicos.

Métodos e Procedimentos

A fim de expressar o VEGFA, diversas técnicas bioquímicas e biomoleculares foram utilizadas. Inicialmente, por meio de transformação, inseriu-se vetores pet_28a_VEGFA contendo a sequência codificante para a proteína de interesse em diversas cepas da bactéria da espécie *Escherichia coli*, com o intuito de realizar uma análise comparativa da expressão proteica nessas cepas em variadas condições de temperatura. As cepas utilizadas foram: BL21DE3, RP, Shuffle e Arctic. Cada uma com particularidades que poderiam ser propícias ou não à expressão do VEGFA.

Uma vez plaqueadas e crescidas as bactérias transformadas, testes de expressão com IPTG foram realizados em meio LB sob a temperatura de 18°C e 37°C a fim de verificar qual condição era mais favorável à expressão qualitativa do VEGFA bem como para avaliar sua solubilidade.

A purificação do VEGFA foi feita por meio de coluna de afinidade de níquel/NTA. Após etapas de desnaturação com uréia, toda a porção solúvel foi submetida a filtração pela coluna de níquel, onde as proteínas do VEGFA contendo His-Tag ficaram retidas na coluna e foram posteriormente eluídas com concentrações crescentes de buffer contendo imidazol e uréia.

Concluídas as etapas de purificação foi necessário realizar o *refolding* do VEGFA para sua conformação nativa. Para isso, empregaram-se métodos de diluição infinita e dialise para remover lentamente as concentrações de uréia que mantinham a proteína desnaturada e solubilizada.

Por fim, foi necessário clivar a cauda de histidina, que geraria interferências nas análises posteriores por RMN. A clivagem foi executada de acordo com os protocolos definidos pelo Thrombin CleanCleave Kit (SIGMA).

Em face a problemas enfrentados com a clivagem da His-tag do VEGFA, buscou-se por alternativas biomoleculares para a expressão

da proteína sem a tag. Para isso foram utilizadas reações de PCR, digestão por enzimas de restrição e enzimas de ligação para a criação de um plasmídio codificante para VEGFA que não incluísse a His-tag.

Resultados

Os testes de expressão nas diversas cepas bacterianas revelaram que as melhores condições para expressão do VEGFA se situam na região dos 37°C com as cepas RP e BL21.

As etapas de purificação e refolding foram bem sucedidas e revelaram bandas no peso molecular adequado, bem como a formação de dímeros, a conformação nativa do VEGFA quando ligado em seu receptor.

No entanto, a etapa de clivagem da His-tag com resina de trombina foi problemática, onde verificou-se a ineficiência do processo e perda da largura de banda da proteína dialisada que foi submetida à clivagem.

Com isso, adotou-se uma nova estratégia, a de criação de um vetor codificante para VEGFA sem a His-tag, por meio de técnicas biomoleculares de PCR, digestão com enzimas de restrição e ligação do inserto amplificado em um novo plasmídio.

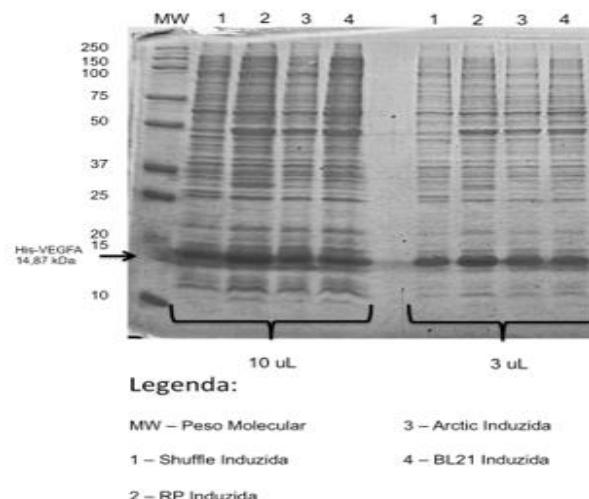


Figura 1: Gel de acrilamida contendo os produtos de indução das diferentes cepas de *E. Coli* transformadas com pet_28a_VEGFA

Conclusões

Por meio dos estudos realizados pôde-se com sucesso produzir o VEGFA em sua conformação natural, condição ideal para as análises subsequentes por RMN que poderão esclarecer seus mecanismos de interação com os domínios de seu receptor VEGFR2. No entanto, problemas experimentais com a clivagem por trombina e achados experimentais de insolubilidade do VEGFA produzido pela expressão bacteriana, levaram a tentativas de expressão do VEGFA sem a His-tag por meio do emprego de técnicas biomoleculares de manipulação do plasmídio pet_28a_VEGFA, possibilitando uma rota mais curta de expressão, purificação e análise desta proteína de grande interesse fisiopatológico.

Agradecimentos

Gratidão incondicional aos orientadores Ricardo Giordano e Angy Liseth por seus ensinamentos, didática e colaboração durante todo o período em que estive no laboratório.

Às agências de fomento, PUB-USP e FAPESP, meu muitíssimo obrigado por tornarem esse projeto possível e darem espaço para florescerem as ideias científicas do Brasil.

Referências

Giordano, R.J., Pasqualini, R., Arap, W. (2010) Mecanismos de Angiogênese e Metástases, Oncologia Molecular, Carlos Gil (ed.), São Paulo: Atheneu editora.