XXX Encontro Anual de Iniciação Científica
VII Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior
eaic 2021

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA PALMITOIL TIOESTERASE 1 (PPT1) COM ANTICORPO MONOCLONAL POR DETECÇÃO ELETROQUÍMICA

Matheus Emanuell Andrade dos Santos (FA), Dhésmon Lima, Karen Wohnrath, Christiana A. Pessôa, Juliana Inaba, e-mail: juinaba@hotmail.com
Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Química.

Bioquímica - Química de Macromoléculas
Palavras-Chave: *Interação, PPT-1, CNL1, eletroquímica, imunossensor.*

Resumo

Lipofuscinose ceroide neural é um grupo de doenças neurodegenerativas que acometem a infância. A CNL1, uma de suas classes, a qual ocorre por uma mutação no gene que codifica para a proteína PPT1, responsável pela remoção de ácidos graxos ligados às proteínas nos lisossomos. Desta forma, ocorre um acúmulo destas biomoléculas nesta organela nos diferentes tecidos, incluindo o neurônio, causando complicações neurológicas nos pacientes. Sendo uma doença rara, possui diagnóstico impreciso e tardio, baseado em imagens e achados clínicos. A detecção da atividade da proteína PPT1 é pouco solicitada e envolve o uso de um método baseado na hidrólise de um análogo de seu substrato e liberação de fluoróforo, processo caro e laborioso.

Este projeto teve como objetivo detectar a interação da PPT1 com anticorpos monoclonais a partir de um eletrodo de carbono vítreo (ECV) funcionalizado com proteína A, por técnicas eletroquímicas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

Introdução

A doença CLN1 é uma patologia autossômica recessiva, neurodegenerativa, que ocorre nos primeiros anos de vida. Nela ocorre perda visual progressiva, diminuição da capacidade intelectual e hipotonia (Geraets et al.,2016). Causada por mutações no gene que codifica para a palmitoil tioesterase 1 (PPT1) diminuindo o número de transcritos/aumento da degradação da proteína traduzida. PPT1 remove ácidos graxos ligados via ligação tioestér à resíduos de cisteína de outras proteínas nos lisossomos. Desta forma, prejudicando a degradação das lipoproteínas que se acumula na organela e em vários tecidos gerando complicações, como atrofia cerebral e cerebelar (Järvelä et al.,1991).

Poucas metodologias estão disponíveis para a detecção da atividade de PPT1. Neste sentido, a sua detecção eletroquímica torna-se atrativa, dado que é uma técnica de fácil execução, sensível e de baixo custo. Neste sentido, o uso de imunossensores destaca-se dada a possibilidade das inúmeras formas de imobilização de anticorpos sobre a superfície de um eletrodo e a detecção específica da proteína alvo (Dos Santos Riccardi et al., 2002).

Material e Métodos

Inicialmente, os ECV foram limpos por meio de polimento, e oxidados em meio de H_2SO_4. Os grupos carboxílicos criados na superfície do ECV foram ativados com uma solução 100 mmol L^{-1} de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 50 mmol L^{-1} de N-hidroxisuccinimida (NHS), durante 30 minutos. Os eletrodos foram então incubados na presença de uma solução 1:500 de proteína A (ProtA) por 60 minutos. Após isso, uma solução 1:500 de anticorpos IgG anti-PPT1 foi depositada sobre os eletrodos, e incubados por 60 minutos. Os sítios expostos foram bloqueados por incubação dos ECV em solução de albumina de soro bovino (BSA) 0,05% por 30 minutos. A cada etapa de modificação, os eletrodos foram lavados com tampão PBS 0,15 mol L^{-1} (pH 7,4).

As medidas eletroquímicas de EIE foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PalmSens e Micro-Autolab II Utilizando uma cela eletroquímica contendo três eletrodos.

Resultados e Discussão

Na Figura 1 verifica-se que os diagramas de Nyquist apresentaram um semicírculo na região de baixas frequências, referente ao processo de transferência de carga na interface eletrodo/solução para a reação redox da sonda eletroquímica. Além disso, ao se comparar o diagrama obtido na ausência de PPT1 com o obtido após a incubação com esta proteína, observa-se um aumento no diâmetro do semicírculo, o que implica em um aumento no valor de resistência à transferência de carga do sistema, indicando a ligação do biomarcador ao imunossensor.

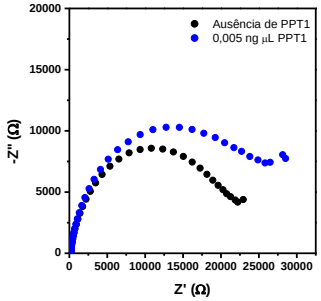


Figura 1: Diagramas de Nyquist obtidos para o imunossensor antes e após incubação em solução contendo 0,005 ng μL^{-1} de PPT1.

Conclusão ou Conclusões

Os resultados indicam que o imunossensor construído foi capaz de identificar a presença de PPT-1 em solução, apresentando potencial aplicação como método diagnóstico para CLN1.

Agradecimentos

A UEPG, C-LABMU, Fundação Araucária

Geraets, R. D., Koh, S. Y., Hastings, M. L., Kielian, T.,Pearce, D. A., & Weimer, J. M. (2016). Moving towards effective therapeutic strategies for Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. In *Orphanet Journal of Rare Diseases* (Vol. 11, Issue 1, pp. 1–13). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s13023-016-0414-2

Järvelä, I., Schleutker, J., Haataja, L., Santavuori, P., Puhakka, L., Manninen, T., Palotie, A., Sandkuijl, L. A., Renlund, M., White, R., Aula, P., & Peltonen, L. (1991). Infantile form of neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN1) maps to the short arm of chromosome 1. *Genomics*, *9*(1), 170–173. https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90235-7

Dos Santos Riccardi, C., Da Costa, P. I., & Yamanaka, H. (2002). Imunossensor amperométrico. *Quimica Nova*, *25*(2), 316–320. https://doi.org/10.1590/s0100-40422002000020002

ISSN 1676-0093