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

DETECÇÃO E AVALIAÇÃO DE INTERAÇÃO ENZIMA-ANTICORPO ATRAVÉS DE IMUNOSSENSOR ELETROQUIMICO: POSSÍVEL FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO PARA DOENÇA DA DEFICIÊNCIA DA ENZIMA ALFA-L-FUCOSIDASE

Tayná Prestes Jacinto (PIBIC,CNPq), Dhésmon Lima, Christiana A. Pessoa, Karen Wohnrath, Juliana Inaba (Orientador), e-mail: juinaba@hotmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Departamento de Química

Ciências Biológicas, Bioquímica, Enzimologia.
Palavras-Chave: *eletrodos, biomarcador, nanomaterial*

Resumo

A fucosidose é uma doença decorrente da deficiência da α-fucosidase, que acarreta acúmulo de glicolipídios e glicoproteínas não degradadas nos lisossomos, ocasionando morte celular, deficiência intelectual, demência e perda da visão. O diagnóstico para essa doença é feito por exames moleculares ou de atividade enzimática, os quais são caros e laboriosos. A detecção de biomarcadores por métodos eletroquímicos tem se mostrado uma ferramenta eficiente, dada a facilidade de manuseio, baixo uso de reagentes, baixo custo, e de resposta rápida. Neste sentido, este projeto consiste na construção de um sistema para a detecção da proteína fucosidase por voltametria de onda quadrada. Foi desenvolvida uma plataforma a partir de eletrodo de carbono vítreo oxidado (ox-ECV) funcionalizado com proteína A (ProtA) para a ancoragem de anticorpos monoclonais. Essa plataforma foi otimizada por planejamento fatorial e as melhores condições de concentração de anticorpo e tempo de incubação foram de diluição 1:250, por 90min. A plataforma foi capaz de detectar a presença do biomarcador no sistema construído, mostrando-se promissora.

Introdução

Fucosidose é uma patologia autossômica recessiva com característica neurodegenerativa relacionada a biossíntese da enzima α-L-fucosidase. A atividade desta enzima está ligada à catálise da clivagem de uma molécula de fucose no fim do processo de degradação de glicolipídios e glicoproteínas. É um distúrbio raro e com diagnóstico baseado em achados clínicos e de imagens que ocorrem de forma tardia e que são inconclusivos para conter os avanços da doença. Neste sentido, os imunossensores eletroquímicos surgem como alternativa diagnóstica. Tais sistemas são baseados na formação de imunocomplexos na superfície de um eletrodo, a partir da imobilização de antígenos ou anticorpos sobre a sua superfície. O sensor quando incubado na solução de interesse, é capaz de se ligar ao seu alvo específico a partir da interação antígeno-anticorpo, gerando sinais elétricos que podem ser detectados.

Material e Métodos

A construção do imunossensor foi baseada em eletrodos de ox-ECV por voltametria cíclica em meio de H_2SO_4 (0,5 mol L^{-1}), tratados com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, 100 mmol L-1 e N-hidroxisuccinimida , 50 mmol L-1, modificado com moléculas de ProtA 1:500 e lavado em tampão PBS 0,15 mol L-1 (pH 7,4). Para os ensaios piloto para validação da plataforma, foram utilizados anticorpos IgG anti-PPT1 e a ligação ao seu antígeno (5 ng µL-1 PPT1) avaliada por voltametria de pulso diferencial na presença de 5,0 mmol L-1 $K4[Fe(CN)]_6/K_3[Fe(CN)]6$ (sonda eletroquímica). Foi realizado planejamento fatorial a fim de otimizar as condições de imobilização de anti-PPT1 sobre a plataforma, variando a concentração de anticorpos [(-) 1:750, (0) 1:500, (+)1:250] e tempo de incubação anticorpos [(-) 30, (0) 60, (+)90 min].

Resultados e Discussão

A fim de se otimizar as condições para imobilização de anti-PPT1 sobre a plataforma ox-ECV/ProtA, um planejamento fatorial foi aplicado

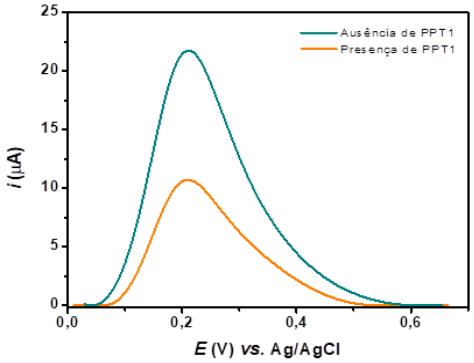


Figura 1: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos na ausência e na presença de PPT1 com o ox-ECV/ProtA/AntiPPT1 de acordo com as melhores condições estabelecidas ([IgG] = 1:250 e t=90min).

Os voltamogramas de pulso diferencial obtidos nas condições otimizadas evidenciaram a detecção de PPT1 pelo imunossensor. Pode-se observar (figura 1) que a intensidade do pico de corrente diminuiu após a incubação dos imunossensores na presença de PPT1, sugerindo que o dispositivo foi capaz de reconhecer e detectar o referido biomarcador. A diminuição na intensidade de corrente acontece como consequência do bloqueio do acesso dos íons $[Fe(CN)_6]^{3-}$ à superfície do eletrodo ocorre devido à presença das proteínas.

Conclusão ou Conclusões

Os resultados apresentados mostraram-se promissores e sugerem a potencialidade de aplicação dos imunossensores desenvolvidos como uma nova estratégia para a detecção da α-L-fucosidase.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo apoio financeiro, à UEPG e ao C-LABMU.

GERAETS, R. D. et al. Moving towards effective therapeutic strategies for Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 11, p. 1–13, 2016

LIMA, D. et al. Label-free impedimetric immunosensor based on arginine-functionalized gold nanoparticles for detection of DHEAS, a biomarker of pediatric adrenocortical carcinoma. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 133, p. 86-93, 2019