XXXII Encontro Anual de Iniciação Científica
IX Encontro Anual de Iniciação Científica Jr.
EAIC 2023

DETECÇÃO E AVALIAÇÃO DE INTERAÇÃO ENZIMA-ANTICORPO ATRAVÉS DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO: POSSÍVEL FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO DE LIPOFUSCINOSE CERÓIDE NEURONAL DO TIPO 1 (CNL1)

Tayna P. Jacinto (PIBIC/FA)[1], Jhenifer B. C. da Rosa[1], Felipe Zahrebelnei[2], Karen Wohnrath[2], Juliana Inaba[2] (Orientador), e-mail: tay.prestes.jacinto@gmail.com; jinaba@uepg.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Farmácia[1], Departamento de Química[2].

Área: Ciências Exatas e da Terra; e subárea do conhecimento: Química.

Palavras-Chave: *Biossensor,Degeneração multissistêmica, Eletroanálise, Eletrodos.*

Resumo

A Lipofuscinose ceróide neuronal do tipo 1 (CNL1) é uma patologia genética decorrente da deficiência enzimática de Palmitoil Tioesterase 1 (PPT1) o que leva à um acúmulo de substrato não degradado nos lisossomos, trazendo uma série de complicações neurodegenerativas.[1] Em busca de diagnóstico precoce para essa doença, os imunossensores eletroquímicos surgem como alternativa aos métodos tradicionais, dada a facilidade de manuseio, baixo custo e resposta rápida e precisa.[2]

Introdução

A deficiência enzimática de PPT1 acarreta em acúmulo de glicolipídios e glicoproteínas não degradadas nos lisossomos, ocasionando morte celular, deficiência intelectual, demência e perda da visão. O diagnóstico é feito por exames moleculares ou de atividade enzimática, os quais são caros e laboriosos e muitas vezes ocorrem tardiamente. Visando uma detecção precoce em busca de melhorias na qualidade de vida dos pacientes, foi desenvolvido um biossensor a partir de eletrodo de carbono vítreo oxidado (ox-ECV) e funcionalizado com proteína A (ProtA) para a ancoragem de anticorpos monoclonais anti-PPT1. [1,2]

Materiais e Métodos

A construção do imunossensor foi baseada na modificação de ECV, oxidados por voltametría cíclica em meio de H_2SO_4 0,5molL-1, tratados com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil carbodiimida (EDC) 100 mmolL-1 e N-hidroxisuccinimida (NHS) 50 mmol L-1, modificados com moléculas de proteína A 1:500, seguida da imobilização de anticorpos monoclonais IgG anti-PPT1 1:750 e BSA 0,05%, sendo as lavagens realizadas em tampão PBS 0,15 mol L-1 (pH 7,4) . Para os ensaios de especificidade, o antígeno PPT1 foi utilizado na concentração de 1 ng/uL e o possível interferente FUCA1 (outra enzima lisossomal) na concentração de 0,4 ng/uL. A interação foi avaliada por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) na presença de 5,0 mmolL-1 $K_4[Fe(CN)]_6/K_3[Fe(CN)]_6$ (sonda eletroquímica).

Resultados e Discussão

Foi avaliada a variação percentual de resistência à transferência de carga entre eletrodo e eletrólito (ΔRct) antes e após a ocorrência do evento de biorreconhecimento baseado na ligação antígeno-anticorpo, utilizando PPT1 e a FUCA1, um possível interferente para avaliar a especificidade. O percentual de ΔRct foi calculado através da Equação 1, onde Rct (biossensor) é referente à Rct do biossensor antes da incubação do antígeno, e Rct (imunoensaio) é referente à Rct após o evento de bioreconhecimento.

$$\Delta Rct = \frac{Rct\ (hibridização) - Rct\ (biossensor)}{Rct\ (biossensor)} \times 100\% \quad (1)$$

Utilizando-se a equação da reta da curva analítica em função da PPT1 (Equação 2), foi calculado o valor teórico de ΔRct para a concentração de PPT1 0,4 ng/uL.

$$y = 11,724x + 101,89. \quad (2)$$

Os valores obtidos de ΔRct (Tabela 1), indicam uma maior resistência à transferência de carga ao realizar o ensaio com PPT1, demonstrando a especificidade do biossensor com o analito de interesse, em função que ΔRct está diretamente relacionado à concentração de enzimas ligadas ao sensor.

Tabela 1. Variação da resistência à transferência de cargas.

	ΔRct
PPT1 1 ng/uL	111,17
FUCA1 0,4 ng/uL	28,75
PPT1 0,4 ng/uL teórico	106,57

Conclusão

Os resultados apresentados demonstraram que o imunossensor eletroquímico desenvolvido possui alta especificidade para o biomarcador, sugerindo a potencialidade de aplicação como uma nova estratégia para a detecção da CNL1 de forma precoce.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pelo apoio financeiro, à UEPG, ao C-LABMU, ao GDEM, Dhésmon Lima e à *Collaborations Pharmaceuticals*.

[1] 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

[2] 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