ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE -
BNS10

GENOSENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM NANORIBBONS DE GRAFENO PARA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBTIPOS ONCOGÊNICOS DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO

R.P.S. LUCENA¹, I.A.M. FRIAS², N. LUCENA-SILVA³,
M.D.L. OLIVEIRA^{4,5}, C.A.S. ANDRADE^{4,5}.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas.

² Departamento de Biotecnologia e Biodiversidade, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT)

³ Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu, Magalhães Fundação Oswaldo Cruz

⁴ Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica PPGIT/UFPE, Recife-PE.

⁵ Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências – UFPE, Recife-PE.

E-mail para contato: csrandrade@pq.cnpq.br

RESUMO – Atualmente, a identificação dos subtipos oncogênicos de HPV é complexa e emprega diversas técnicas complementares como a captura híbrida, southernblot, hibridização in situ, PCR, entre outras. Por este motivo, construímos um genossensor impedimétrico baseado em nanoribbons (nanofitas) de grafeno capaz de detectar e identificar, rapidamente, diversos subtipos oncogênicos de papiloma vírus humano. Para isto, foi desenvolvido um método de sintetizar nanofitas de grafeno, cuja alta sensibilidade elétrica é aproveitada para servir como transdutor capaz de analisar amostras genéticas na faixa de picograma/microlitro. A camada de reconhecimento biológico foi construída empregando uma sequência genômica usada consensualmente (MY11) para a amplificação de DNA de um amplo espectro de subtipos de HPV. A metodologia proposta consegue detectar especificamente os vírus do HPV e ainda mais, agrupá-los segundo seu grau de oncogenicidade. Os resultados mostram que a partir da resposta eletroquímica complexa, podemos encontrar a relação filogenética que existe entre os genomas dos distintos HPV analisados.

Palavras-Chave: Biossensor; Nanoestruturas de Carbono; Diagnóstico de HPV

ABSTRACT – Currently, the identification of oncogenic HPV subtypes is complex and employs several complementary techniques such as hybrid capture, southernblot, in situ hybridization, PCR, among others. For this reason, we constructed an impedimetric genossensor based on graphene nanoribbons that quickly detects and identifies several oncogenic subtypes of human papilloma virus. For this purpose, we synthesized graphene nanoribbons, whose high electrical sensitivity enhanced the transducer effect capable of analyzing genetic samples in the picogram / microliter range. The biological recognition layer was constructed with a consensus genomic sequence (MY11) employed to amplify a broad spectrum of HPV subtypes DNA. The proposed methodology can specifically detect HPV viruses and even more, group them according to their oncogenicity degree.

The results show that from the complex electrochemical response, we can find the phylogenetic relationship that exists between the genomes of the different analyzed HPVs.

Keywords: Biosensor; Carbon Nanostructures; HPV diagnostics

1. INTRODUÇÃO (FONTE 14)

O papiloma vírus humano (HPV) é um DNA-vírus que infecta células epiteliais e da mucosa causando diversos tipos de lesões como a verruga comum e a verruga genital (Crosbie *et al*, 2013). Estão causalmente envolvidos na patogênese do câncer anogenital e particularmente câncer do colo do útero, onde se referem a uma condição patológica neoplásica caracterizada pela proliferação celular anormal de um tumor.

O câncer de colo de útero também conhecido como cancro uterino, se refere a uma condição patológica neoplásica caracterizada pela formação de um tumor maligno no tecido uterino que atinge, principalmente, as regiões do cérvix e/ou endométrio. No Brasil, se apresenta como o terceiro tipo de câncer mais comum nas mulheres, ficando atrás apenas do câncer de mama e do câncer de colo-retal, sendo, a quarta causa mais comum de morte de mulheres por câncer (Inca, 2016). Em 2013, foi responsável por 5.430 mortes no Brasil e estima-se que em 2016 possam surgir 16340 novos casos, sendo assim, um importante problema de saúde pública (Inca, 2016).

Os HPVs mais comuns são HPV 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 e as infecções com estes tipos estão associadas à maioria dos cânceres anogenitais. Baixo risco tipos tais como HPV 6 e 11 são comumente associados a verrugas e lesões anogenitais. Globalmente, o HPV 16 e 18 são os genótipos HPV dominantes e são responsáveis por causar a maioria dos cânceres anogenitais, como câncer cervical em mulheres (Mandishora *et al.*, 2017).

Os testes atualmente empregados para diagnosticar câncer anal e cervical não são imediatos, de fato, ser diagnosticado com HPV de alto risco não significa que o paciente desenvolveu câncer. Inicialmente, uma inspeção direta da região afetada é realizada pelo uso de um tubo iluminado curto que é inserido através do ânus ou cérvix para visualizar o canal. Se alguma massa suspeita é encontrada, uma biópsia é realizada. Estas pequenas amostras de tecidos são examinadas sob microscopia por um patologista treinado que determinará se há presença de células escamosas com morfologia atípica, e, portanto, infecção com HPV. A depender da análise do especialista, a mesma amostra pode ser empregada para realizar um teste de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) que determinará o subtipo de HPV infectando o paciente, regularmente, subtipos mais frequentes como 16 e 18 são procurados. Existem kits de detecção que incluem os subtipos 31, 33, 35, 45, 52 e 58, mas são menos frequentes devido a seu preço. Cabe salientar que, embora altamente específico e confiável, realizar o diagnóstico molecular pela técnica de PCR requer pessoal devidamente treinado, assim como instrumentos, equipamentos e instalações especiais que distam bastante da realidade em que muitos centros de saúde operam.

Desta forma, se faz necessário o desenvolvimento de métodos analíticos com potencial inovador que possibilitem o rápido diagnóstico e identificação do subtipo de HPV infectante, tais como os biossensores. Um biossensor é um dispositivo no qual materiais de origem biológica, tais como proteínas, organelas, tecidos, microrganismos, antígenos ou anticorpos, ácidos nucleicos entre outros, são imobilizados como iscas junto a um material transdutor adequado que reconhecerá e amplificará o sinal

de detecção. O objetivo de desenvolver um biossensor é associar a seletividade do reconhecimento do analito, pelo componente biológico ativo, com a sensibilidade do transdutor. Os biossensores desenvolvidos são comparados em termos de precisão, reprodutibilidade, regeneração, estabilidade e especificidade. O diagnóstico sensível e precoce, minimiza os custos com saúde pública e tratamento medicamentoso, bem como melhora a qualidade de vida do paciente. Métodos eletroanalíticos, tais como voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), fazem uso de propriedades elétricas mensuráveis (potencial, carga e corrente) e podem ser utilizadas para o estudo da interação entre biomoléculas e plataformas nanoestruturadas composta por nanomateriais.

O uso de folhas de grafeno tem sido relatada na literatura devido a sua eficácia em melhorar o desempenho eletroquímico, facilitando a imobilização de biomoléculas e sendo favorável para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos (Shan et al., 2009; Bao et al., 2011). O grafeno é um material que cresce em duas dimensões (comprimento e largura). Nanofitas de grafeno são similares ao grafeno, mas resultam da abertura dos tubos. Diferente do grafeno, as fitas de grafeno sintetizadas têm a característica de crescer em uma dimensão (comprimento), o que aumenta a relação área/borda e assim o número de sítios de funcionalização. Neste trabalho, foram preparadas fitas de grafeno funcionalizadas com grupos tiol, mesmos que favorecem a imobilização sobre um eletrodo de ouro. Os grupos carboxila remanescentes nas nanofitas, promovem a ancoragem covalente da sonda degenerada (MY11) aminada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A análise eletroquímica foi realizada através de um potenciostato/galvanostato PGSTAT 302N, utilizando uma célula eletroquímica composta por três eletrodos, sendo um contra eletrodo de platina, um eletrodo de referência Ag/AgCl e um eletrodo de trabalho de disco de ouro. Como sonda redox, foi utilizada uma solução de 20 mL de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ (1:1). As análises de voltametria cíclica (VC) foram realizadas a um potencial de varredura fixo de -0,2 a 0,7 V. A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foi obtida numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV. O software NOVA 1.8 foi utilizado na aquisição dos dados obtidos das análises eletroquímicas e o software origin 7.0 para confecção dos gráficos e obtenção de dados matemáticos. As análises de microscopia de força atômica serão realizadas num equipamento modelo SPM-9700, Shimadzu.

O grafeno foi sintetizado e modificado quimicamente com grupos terminais sulfidrilas e grupos carboxílicos segundo o protocolo de patente registrada sob o número BR1020150012705. A diluição do grafeno foi realizada em acetona, onde 10 mg de grafeno foi dissolvido em 20mL de acetona. Posteriormente, a solução foi sonicada por 10 minutos para homogeneização do sistema.

As nanofitas de grafeno foram preparadas a partir da exfoliação de nanotubos de carbono multicamada usando uma rota físico-química por via tratamento ácido, seguido de tratamento com peróxido de hidrogênio. Finalmente, as NFG foram funcionalizadas com grupos tiol para favorecer a imobilização sobre um eletrodo de ouro, e também com grupos carboxila para promover a ancoragem covalente da sonda degenerada aminada.

Em adição, os eletrodos contendo a plataforma genossensora foram construídos simultaneamente para realização das análises. Antes da adsorção do grafeno na superfície de ouro do eletrodo, realizamos um procedimento de limpeza, passado esse tempo, a

resposta do eletrodo limpo inicial foi avaliada por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

Em seguida, o grafeno foi homogeneizado junto com 0.01mM de DTT (DL-Ditiotreitol) para promover a redução dos grupos dissulfeto. Para caracterizar a base transdutora, 2 μ L da solução de grafeno foram gotejados sobre o disco de ouro, deixando passar 30 minutos em incubação antes de começar as análises de VC e EIE.

Para promover a imobilização da sonda de DNA, os grupos carboxílicos do grafeno foram ativados empregando 4 μ L de uma solução de EDC:NHS (1:1) via drop coating sobre o eletrodo modificado com grafeno. Passados 10 minutos, 2 μ L da solução de primer aminado foi gotejada sobre o eletrodo modificado ativado. O primer foi incubado por 1 hora para permitir a imobilização covalente da sonda. Cada etapa de modificação do eletrodo foi seguida de uma análise de VC e EIE.

Por fim, a capacidade sensora do genossensor foi avaliada frente a amostras de DNA de pacientes. Essas amostras foram aquecidas numa temperatura 90°C, e gotejado 2 μ L na plataforma sensora, em seguida foi feita as análises de VC e EIE. Onde nossos resultados permitiram identificar com certo grau de liberdade a relação filogenética existente entre os subtipos de HPV testados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 corresponde a caracterização voltamétrica da camada nanoestruturada constituída por grafeno. A partir da análise dos voltamogramas cíclicos, pode-se observar uma mudança no comportamento eletroquímico do eletrodo de ouro após a adsorção do grafeno, onde verifica-se uma pequena redução das correntes de pico anódicas e catódicas. Logo, pode-se afirmar que a imobilização deste elemento origina uma camada auto-organizada sobre a superfície de trabalho, bloqueando parcialmente o processo de oxido-redução dos eletrólitos na dupla camada elétrica.

As análises impedimétricas estão de acordo com os gráficos de VC, o que demonstrou o adequado processo de adsorção do grafeno sobre o eletrodo de trabalho. Em adição, observa-se o aumento da resistência de transferência de carga, o que reflete a presença de moléculas imobilizadas sobre a superfície em estudo.

Figura 1. Análises de VC e EIE após a adsorção do grafeno sobre o eletrodo de ouro.

Após a imobilização covalente do primer foi observada uma queda da resposta amperométrica do sistema (figura 2), especialmente na região anódica demonstrando o processo de adsorção da biomolécula sobre a superfície do eletrodo.

Figura 2. Análise de VC do processo de imobilização do primer após ativação via EDC:NHS.

Desta forma, é possível perceber a viabilidade de se utilizar o grafeno como nanoestrutura para a imobilização da sonda e sua possível utilização como genossensor para HPV. Foi realizado uma análise eletroquímica da relação filogenética entre distintos genomas de HPV.

Inicialmente foram escolhidas as amostras de HPV 33, 51, 53, 62 e 66. Como característica especial destas amostras apontamos que HPV 53 e 66 se encontram no mesmo ramo filogenético, e por outro lado, as amostras HPV 33, 51 e 62 se encontram em diferentes ramos filogenéticos respectivamente (Figura 3).

Ao analisar a resposta impedimétrica das amostras analisadas pelo nosso biossensor encontramos uma notória diferença entre elas. Os parâmetros impedimétricos foram obtidos a partir das respostas espectroscópicas mostradas na figura 3, ao realizar o ajuste matemático com o circuito equivalente. Da mesma forma, amostras de *Candida albicans* e *Mycobacterium tuberculosis* foram analisadas como controles negativos para avaliar a especificidade do biossensor.

Figura 3. Resposta impedimétrica do biossensor NFG-MY11 para a) HPV53, b) HPV 51, c) HPV53, d) HPV62, e) HPV66, e amostras negativas f) *Candida Albicans* e *Mycobacterium tuberculosis*.

Como pode ser observado na figura 4 onde é apresentada a relação existente entre os parâmetros impedimétricos obtidos pelo ajuste com o circuito equivalente das respostas eletroquímicas. Acontece uma agrupação das respostas correspondentes às amostras HPV 51, 53 e 66. Já as amostras HPV 33 e 62 se encontram distanciadas. Quando as amostras de HPV são comparadas com as amostras negativas, podemos observar que as amostras de HPV se encontram mais próximas entre elas, mantendo uma certa distância dos controles negativos.

Figura 4. Gráfico tridimensional para os valores Rct, Q e n, obtidos como resultado do ajuste dos resultados com o circuito equivalente.

Acontece um agrupamento das respostas correspondentes às amostras HPV 51, 53 e 66. Já as amostras HPV 33 e 62 se encontram distanciadas. Quando as amostras de HPV são comparadas com as amostras negativas, podemos observar que as amostras de HPV se encontram mais próximas entre elas, mantendo uma certa distância dos controles negativos.

Figura 5. Árvore filogenética apresentando a relação genética entre os subtipos associadas a lesões anogenitais.

O resultado esperado era que as amostras HPV 53 e 66 fossem as únicas agrupadas, porque pertencem ao mesmo ramo filogenético. Contudo, ao analisar a relação filogenética (figura 5) entre estas amostras e nossos resultados, encontramos que os subtipos HPV 51, 53 e 66 têm em comum serem subtipos de HPV associadas às lesões anogenitais (figura 4).

4. CONCLUSÃO

Foi identificado o potencial de diagnóstico de uma plataforma biossensora capaz de detectar e identificar eletroquimicamente a relação filogenética existente entre amostras contendo diferentes subtipos de HPV. A plataforma desenvolvida é capaz de analisar eletroquimicamente a relação filogenética entre os distintos genomas de HPV, onde encontramos possíveis agrupamento dos subtipos do HPV 51, 53 e 66 que pertencem ao mesmo ramo filogenético dos subgrupos de HPV associado a lesões anogenitais. Desenvolvemos um novo método para a detecção e identificação de subtipos de HPV. O genossensor apresentou uma importante capacidade sensora, além de possuir potencial para automação e, como consequência, aplicação em análises clínicas.

5. REFERÊNCIAS

Bao, H., Pan, Y., Ping, Y., Sahoo, N. G., Wu, T., Li, L., Li, J., Gan, L. H. Chitosan functionalized graphene oxide as a nanocarrier for drug and gene delivery. *Small*. v. 7, p. 1569–1578, 2011.

Crosbie, E. J., Einstein, M. H., Franceschi, S., Kitchene, H. C. Human papillomavirus and cervical cancer, 2013. Inca - instituto do Câncer, 2016.

Mandishora, R. S.D., Christianse, I. K., Ombe, N. C., Dure, K., Ngara, B., Rounge, T. B., Meisal, R., Ambur, O. H., Palefsky, J. M., Pedersen, B. S., Chirenje, Z. M. Genotypic diversity of anogenital human papillomavirus in women attending cervical cancer screening in Harare, Zimbabwe, 2017.

Patil, J., Vickery, J. L., Scott, T. B., Mann, S. Aqueous stabilization and self-assembly of graphene sheets into layered bio-nanocomposites using DNA. *Advanced Materials*. v. 21, p. 3159–3164, 2009.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à CNPq e à FINEP pelo termo de outorga concedido para esta bolsa e fontes de recursos do projeto de pesquisa.