ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE -
BNS22

CONSTRUÇÃO DE UM BIOSSENSOR DE DNA ELETROQUÍMICO BASEADO EM ELETRODEPOSIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO (AuNPs) SOBRE MPTS PARA BIODETECCÃO DA NEUROESQUISTOSSOMOSE

Caldas, R.G.S.C.C.¹; Santos, G.S.^{1,2}; Melo, F.L.³; Andrade, C.A.S.¹; Oliveira, M.D.L.^{1,2}

¹Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, UFPE.

²Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, UFPE.

³Lab. Doenças Transmissíveis, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

E-mail para contato: Raquel.caldas@outlook.com

RESUMO – O comprometimento do sistema nervoso central pelo *Schistosoma mansoni* ocasiona uma grave patologia na qual o prognóstico depende em grande parte do diagnóstico e tratamento precoce. Neste estudo foi realizada a análise do processo de interação desde as camadas auto-montadas de 3-mercaptopropiltrimetoxissilano (MPTS) até a subsequente deposição eletroquímica de nanopartículas de ouro (AuNPs), para o desenvolvimento de um genossensor para a detecção da neuroesquistossomose. Para isto a técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) foi utilizada, como um método de análise eletroquímico e mostrou-se satisfatória para o desenvolvimento do biossensor. A partir da análise dos resultados foi possível verificar que o nanocompósito manteve a capacidade de estabelecer uma imobilização estável do primer e processo de hibridização específico para a esquistossomose. Os resultados demonstraram que a plataforma é altamente indicada como método de detecção não invasivo, de baixo custo apresentando sensibilidade e especificidade.

PALAVRAS-CHAVE: Neuroesquistossomose; biossensor; diagnóstico.

ABSTRACT - The involvement of the central nervous system by *Schistosoma mansoni* causes a serious pathology in which the prognosis depends largely on early diagnosis and treatment. In this study an analysis of the interaction process was performed from self-assembled layers of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTS) to the subsequent electrochemical deposition of gold nanoparticles (AuNPs) was performed for the development of a genosensor for the detection of neuroschistosomiasis. For this purpose, the electrochemical impedance spectroscopy (EIS) technique was used as a method of electrochemical analysis and proved to be satisfactory for the development of the biosensor. From the analysis of the results it was possible to verify that the nanocomposite maintained the capacity to establish a stable immobilization of the primer and specific hybridization process for schistosomiasis. The results demonstrated that the platform is highly indicated as a non-invasive, low cost detection method with sensitivity and specificity.

KEYWORDS: Neuroschistosomiasis; biosensor; diagnosis

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansoni é endêmica em mais de cinquenta países, incluindo alguns países da América do Sul, da África, entre outros (KATZ, PEIXOTO, 2000). A neuroesquistossomose é caracterizada pela infecção do sistema nervoso central (SNC) pelo *Schistosoma mansoni*. A esquistossomose medular é uma das manifestações clínicas mais graves desta doença e a mais comum manifestação neurológica da infecção por *S. mansoni* (BRUSCKY et al., 2016)

Apesar dos ensaios de laboratório disponíveis, o diagnóstico da neuroesquistossomose, é em grande parte presuntivo, e com base em dados clínicos. Sendo assim, o emprego de metodologias diagnósticas alternativas que permitam a eficiente detecção do parasita mesmo em baixas concentrações deverá contribuir muito para o controle desta doença (DE SOUZA ANDRADE FILHO et al., 2016). Genossensores são promissoras ferramentas diagnósticas devido ao seu potencial para a detecção rápida de sequências de DNA (GUISEPPI-ELIE, LINGERFELT, 2005). Desta forma, utilizamos a sonda de DNA imobilizada no eletrodo para ensaios de hibridização. O uso de nanopartículas para a imobilização das sondas de DNA, se deve as suas características, tais como aumento na superfície de contato, biocompatibilidade e a alta capacidade de adsorção. As nanopartículas de ouro (AuNPs) são usadas para imobilizar biomoléculas com destaque para as sondas de DNA modificadas na superfície do eletrodo, devido às suas propriedades, tais como reter a atividade biológica, condução eficiente do sinal eletroquímico entre transdutor e interface o que permite amplificar a resposta elétrica. O organosilano 3-mercaptopropil trimetoxisilano (MPTS) oferece monocamada auto-montada em ouro e age de forma comprovadamente eficiente entre a superfície do eletrodo e filmes sol-gel derivados (CHEUNG et al., 2003; LI et al., 2010) permitindo o ancoramento das AuNPs e posterior imobilização de biomoléculas.

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma ferramenta importante para a compreensão dos processos de interação que ocorrem na interface solução/eletrodo. A EIE mostra alterações significativas na resistência à transferência de carga após a exposição de sonda de DNA, e tem sido amplamente aplicada, com propósito de complementar os estudos na bioeletroquímica para desenvolvimento de biodispositivos (WANG, LI, 2001; CHENG et al., 2002).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para montagem das camadas auto-montadas foram utilizados 4 uL da solução de MPTS (50mM) que foi gotejada sobre eletrodo de trabalho e incubado por 1 hora para secar a temperatura ambiente (25° C). Após a montagem da camada de MPTS, foi realizada uma eletrodeposição controlada de AuNPs em modo potenciostático. Posteriormente, o eletrodo foi lavado com água destilada e seco a temperatura ambiente.

Após a deposição eletroquímica, 2uL da sonda_{schistosoma} foi depositado sobre o eletrodo modificado e ficou incubado por 1h. Em seguida, foi adicionado BSA (10 ug/mL) para bloqueio dos sítios ativos remanescentes. Por fim, o sistema sensor foi exposto a diferentes concentrações do DNA genômico. O Dna genômico foi fornecido pela Fiocruz-PE. As análises de adsorção ao eletrodo foram realizadas após cada etapa de modificação da superfície. Os experimentos de EIE foram realizados em um Potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT128N numa célula convencional de três

eletrodos. O eletrodo de trabalho (ET) utilizado foi o de ouro modificado, o eletrodo de platina foi utilizado com contra-eletrodo e o de Ag/AgCl como eletrodo de referência. As medidas de impedância eletroquímica foram realizadas numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV (OLIVEIRA et al, 2008). Os gráficos de impedância eletroquímica (gráficos de Nyquist) foram submetidos a análise de dados através do programa EQUIVCRT (BOUKAMP, 1986), com o objetivo de explorar o comportamento interfacial do sistema sDNAShistosoma-AuNPs-MPTS frente ao genoma.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de métodos eletroquímicos para obtenção de nanopartículas tem se mostrado vantajoso por aumentar a condutividade do eletrodo, facilitar a transferências de elétrons além de melhorar a sensibilidade analítica e seletividade (KIM et al., 2008). Neste contexto, o comportamento eletroquímico do eletrodo modificado com MPTS/AuNPs foi caracterizado por EIE. Inicialmente, o diagrama de Nyquist para o eletrodo de ouro refletiu um comportamento limitado por difusão. Depois da modificação do eletrodo com o MPTS houve um aumento do semicírculo comprovando a formação da camada de MPTS na superfície do eletrodo. O grupamento tiol expostos pelo MPTS é importante para a posterior ancoragem das nanopartículas de ouro (AuNPs) via eletrodeposição. Seguida da eletrodeposição das AuNPs houve um decréscimo no diâmetro do semicírculo. Este comportamento indica que as AuNPs foram eficientemente ancoradas pelo grupamento tiol expostos pelo MPTS levando ao aumento da área de superfície eletroativa do eletrodo. Com a imobilização da sonda de DNA tiolada, ocorreu novo aumento do diâmetro, em decorrência à repulsão eletrostática entre o par redox e a sonda de DNA na superfície do eletrodo (Figura 1). Os sítios ativos remanescentes foram bloqueados pela adsorção de BSA. Este processo foi evidenciado por meio de um novo aumento no diâmetro do semicírculo.

Figura 1. Análise impedimétrica das etapas de montagem do genossensor.

Por fim após adição de amostra com DNA complementar, um novo aumento foi observado indicando a ocorrência do processo de hibridação. O sistema foi capaz de interagir com o genoma de *S. mansoni* em diferentes concentrações, apresentando um limite de detecção de 0,5 pg.mL⁻¹ (Figura 2).

Figura 2. Análise impedimétrica do genossensor frente a diferentes concentrações do DNA de *Schistosoma mansoni*.

4. CONCLUSÃO

Com base nas análises dos resultados obtidos, concluímos que a plataforma desenvolvida foi eficiente no reconhecimento para o DNA de *S. mansoni*, sendo específico e sensível para esse verme. O genossensor eletroquímico conseguiu obter a detecção do verme presente nas amostras de LCR de paciente infectados, em diferentes concentrações.

5. REFERÊNCIAS

- BOUKAMP, B. A. A package for impedance/admittance data analysis. **Solid State Ionics**, v. 18, p. 136-140, 1986.
- BRUSCKY, I.S. et al. Nested polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid for diagnosing spinal cord schistosomiasis: A promising method. **Journal of the neurological sciences**, v. 366, p. 87-90, 2016.
- CHENG, TZONG-JIH; LIN, TSUN-MEI; CHANG, HSIEN-CHANG. Physical adsorption of protamine for heparin assay using a quartz crystal microbalance and electrochemical impedance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 462, n. 2, p. 261-273, 2002.
- CHEUNG, M.K.L. et al. 5'-Thiolated Oligonucleotides on (3-Mercaptopropyl) trimethoxysilane- Mica: Surface Topography and Coverage. **Langmuir**, v. 19, n. 14, p. 5846-5850, 2003.
- DE SOUZA ANDRADE FILHO, A. et al. NEUROESQUISTOSSOMOSE. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, v. 19, 2016.

GUISEPPI-ELIE, A.; LINGERFELT, L. Impedimetric detection of dna hybridization: Towards near-patient dna diagnostics. **Immobilisation of DNA on Chips I**, p. 161-186, 2005.

KIM, GHA-YOUNG et al. Optimized coverage of gold nanoparticles at tyrosinase electrode for measurement of a pesticide in various water samples. **Journal of hazardous materials**, v. 156, n. 1, p. 141-147, 2008.

LI, F. et al. Gold nanoparticles modified electrode via a mercapto-diazoaminobenzene monolayer and its development in DNA electrochemical biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 9, p. 2084-2088, 2010.

OLIVEIRA, M.D.L et al. Electrochemical evaluation of lectin–sugar interaction on gold electrode modified with colloidal gold and polyvinyl butyral. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 1, p. 13-19, 2008. ROSE, M.F. et al. Atypical presentation of cerebral schistosomiasis four years after exposure to *Schistosoma mansoni*. **Epilepsy & behavior case reports**, v. 2, p. 80-85, 2014.

WANG, Q.; LI, N. Electrocatalytic response of norepinephrine at a thiolactic acid self-assembled gold electrode. **Talanta**, v. 55, n. 6, p. 1219-1225, 2001.

KATZ, Naftale; PEIXOTO, Sérgio Viana. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 33, n. 3, p. 303-308, 2000.

6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e UFPE pelo apoio financeiro e incentivo a pesquisa.