

Diagnóstico precoce de Zika vírus utilizando imunossensor eletroquímico baseado em nanoestruturas de ZnO

aline.faria@cti.gov.br

Resumo

Neste trabalho foi demonstrado o desenvolvimento de um sensor eletroquímico para detecção de Zika vírus via anticorpo ZIKV-NS1 ancorados em nanoestruturas de ZnO em Placa de Circuito Impresso (PCI). As nanoestruturas de ZnO foram crescidas em PCI via deposição de banho químico (DBQ) e caracterizadas por MEV. O anticorpo anti-ZIKV-NS1 foi imobilizado via cistamina e glutaraldeído e os imunossensores foram caracterizados por microscópio confocal de fluorescência e FTIR. O Imunossensor foi avaliado por voltametria cíclica (VC), sendo obtida linearidade na resposta ao antígeno na faixa de $0,1 \text{ ng.mL}^{-1}$ a 100 ng.mL^{-1} . O limite de detecção ficou abaixo $1,00 \text{ pg.mL}^{-1}$. O imunossensor desenvolvido foi capaz de detectar o Zika Vírus na urina, sem diluição, de forma rápida e sem reação cruzada com DENV. O imunossensor para ZIKV é portátil, de baixo custo, de fácil utilização que o faz ideal para aplicações em Unidades de Pronto Atendimento.

Palavras-chave: Imunossensor; ZnO; Zika vírus.

1. Introdução

A tecnologia de biossensores eletroquímicos tem sido considerada promissora para dispositivos de ponto de atendimento (SASSOLAS ET AL, 2012). O eletrodo de trabalho baseado em nanomateriais é uma promessa, pois proporciona baixos limites de detecção e melhor seletividade que os ensaios tradicionais (AFSAHI, ET AL, 2018). Dentre materiais promissores estão os nanobastões de óxido de zinco (NBs-ZnO), que são facilmente sintetizados e possuem grande área específica (Anno et al, 1995) (GONZALEZ-CHAVARRI ET AL, 2018). Como um semicondutor com alta estabilidade química, os NBs-ZnO fornecem uma superfície adequada para imobilizar anticorpos (RUI ET AL, 2019). Recentemente demonstramos o uso de eletrodos de trabalho baseados em NBs-ZnO como um eletrodo de trabalho altamente sensível e econômico (GASPAROTTO ET AL, 2017). Com relação aos bioreceptores, o uso de anticorpos monoclonais torna os biossensores mais seletivos (SHARMA ET AL, 2016). A proteína não estrutural 1 é uma molécula importante dos vírus no grupo dos flavivírus, incluindo o vírus Zika e a Dengue (XU ET AL, 2016; BROWN ET AL, 2016). Estudos recentes mostraram que a conformação da proteína ZIKV-NS1 possui características únicas quando comparada às proteínas NS1 de outros flavivírus (SONG ET AL, 2016). Isso sugere que o NS1 pode ser um potencial alvo marcador para o diagnóstico seletivo da infecção pelo Zika sem reação cruzada com outro flavivírus. A proteína ZIKV-NS1 pode ser detectada na urina, portanto, sem coleta invasiva de sangue, desde os primeiros sintomas até o sétimo dia de infecção, mesmo antes de aparecer anticorpo específico (CDC, 2019). O principal problema de usá-lo é encontrar uma proteína NS1 específica para o ZIKV sem reação cruzada com a dengue. Neste trabalho o eletrodo de trabalho baseado em NBs-ZnO foi combinado com o anticorpo anti-proteína ZIKV-NS1 para detectar o antígeno ZIKV-NS1 na urina sem reação cruzada com a dengue. O teste para diagnóstico desenvolvido é específico, econômico, rápido e pode ser usado como dispositivo em Unidades de Pronto Atendimento. O teste é feito na urina sem filtragem ou diluição e o biossensor pode ser lido em um potenciostato portátil. Essas características o tornam ideal para uso em fronteiras de portos e aeroportos para viajantes que retornam de áreas endêmicas. O teste também pode fazer parte do pré-natal e ser usado nos centros de saúde para

identificar pacientes com ZIKV. Além disso, as informações obtidas pelo biossensor do ZIKV podem ser utilizadas para o manejo da doença e identificação de áreas endêmicas.

2. Materiais e Métodos

2.1 Construção da plataforma sensora e crescimento das nanoestruturas de ZnO em PCB

Para construção do sensor foi depositado filme de ouro (Au), por método eletrolítico. Após o recobrimento, as placas foram fresadas e cortadas na prototipadora de circuito impresso (Protomat S103/LPKF) para formação do sensor trabalho e contra eletrodo. Para o eletrodo de referência foi utilizada tinta epóxi de prata. Para suporte de crescimento de nanobastões de ZnO sobre os sensores, monofolhas de óxido de grafeno foram depositadas pelo método de spray coating. Foram preparadas nanoestruturas de óxido de zinco (ZnO) utilizando a técnica de deposição por banho químico e deposição por spray. Para a síntese dos nanobastões por banho químico utilizou-se nitrato de zinco e Hexametilenotetramina em água deionizada. O crescimento foi realizado em banho de silicone, com agitação e aquecimento. A caracterização das amostras foi realizada por EC-MEV.

2.2 Imobilização da superfície com anticorpo monoclonal e caracterização dos imunossensores

O anticorpo específico anti-ZIKV-NS1 foi imobilizado na superfície das nanoestruturas, via reação com o glutaraldeído. A verificação da imobilização do anticorpo a base sensora foi realizada por microscopia confocal de fluorescência. Nesta etapa os imunossensores foram incubados com anticorpo secundário fluorescente Alexa fluor 594 na concentração (1:500) por 1h a temperatura ambiente. Seguido da lavagem e montagem em lâmina. Os imunossensores foram avaliados quanto à intensidade de fluorescência em microscópio confocal. Os imunossensores também foram avaliados por FTIR. Após a imobilização dos anticorpos na base sensora e definição da concentração a ser utilizada, foi analisada a reprodutibilidade e repetibilidade do imunossensor. A repetibilidade foi avaliada através da leitura de 10 voltamogramas cíclicos de um mesmo sensor. A Reprodutibilidade foi avaliada comparado os voltamogramas cíclicos de diferentes imunossensores. As análises de curva padrão, linearidade e limite de detecção foram realizadas pela incubação do antígeno com o imunossensor seguindo o seguinte protocolo: após imobilização do anticorpo, como descrito previamente, as bases foram lavadas com PBS e em seguida incubadas com diferentes concentrações do antígeno por 1h em temperatura ambiente e a avaliação foi realizada por análise de VC. A especificidade foi avaliada ao incubar os imunossensores com antígenos não específicos, por 1h em temperatura ambiente em seguida submetidos a VC.

2.3 Análise do imunossensor com amostra de urina

A seletividade do imunossensor foi avaliada em amostras de urina humana, por western blot e VC. As amostras de urina humana foram coletadas em tubo estéril e imediatamente usadas. Amostra foram utilizadas sem diluição e com a adição do antígeno. As sensores foram incubados nas amostras durante 60 min.

2.4 Voltametria Cíclica

Em cada etapa, do desenvolvimento da matriz sensora à imobilização das espécies biológicas, foram realizadas medidas eletroquímicas utilizando um Potenciostato/Galvanostato com módulo de impedância modelo PGSTAT302N(AUT302N.FRA2V) da Metrohm Autolab.

Os estudos eletroquímicos foram realizados verificando o comportamento do par eletroquímico $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{4-}/(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-}$.

3. Resultados

3.1 Base Sensora

A estabilidade do sensor foi avaliada por sucessivos VCs, com potencial de -0.7 a 0.7V (Figura 1a). Os picos redox foram constantes mesmo após 10 ciclos. O coeficiente de variação, calculado com base no I_{pa} , foi de 2,5%, validando a excelente estabilidade da base sensora. Após o crescimento das NBs-ZnO as bases sensoras foram caracterizadas por MEV (Figura 1b-c). As micrografias mostram que as NBs-ZnO crescem perpendicularmente à placa com boa densidade. Devido à maior superfície, o uso de NBs-ZnO pode ser um bom caminho para aumentar a seletividade e o limite de detecção do biossensor.

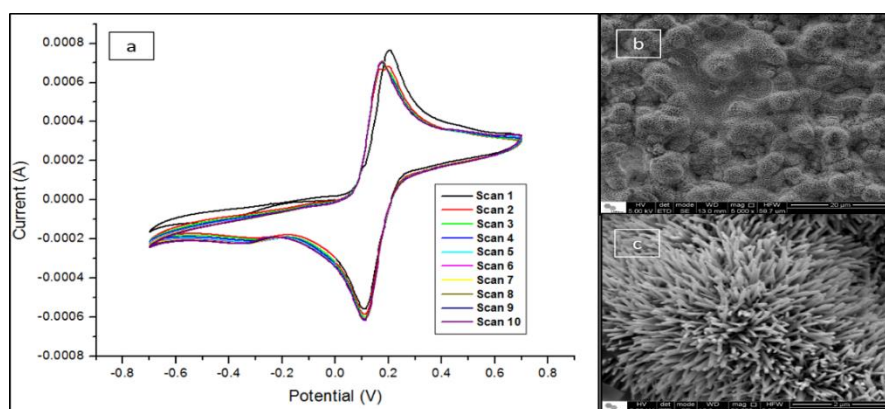


Figure 1 - a) VC de base sensora, com 10 varreduras. VC realizado com taxa de varredura de $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. b- c) Imagem de MEV das nanoestruturas de ZNO crescidas no eletrodo trabalho, 5000x e 50000x respectivamente

3.2 Imobilização anticorpo monoclonal anti-ZIKV-NS1

A especificidade do sensor está fortemente relacionada às propriedades do elemento de detecção imobilizado. O uso de anticorpos é uma excelente ferramenta para a fabricação de biossensores, por serem altamente específicos. A fim de avaliar a especificidade da ligação anticorpo-antígeno, foi realizada uma análise de Western blotting usando 200ng ZIKV-NS1 (Figura 2a). Apenas uma banda, em torno de 50 kDa, aparece na análise. O resultado indica a pureza da proteína ZIKV-NS1 e a alta seletividade do anticorpo. Outro parâmetro crucial no desenvolvimento de biossensores de baixo custo é o uso da menor quantidade possível de anticorpo. Portanto, testamos a imobilização do anticorpo com três diferentes concentrações. As curvas VC revelam uma redução nos valores de I_{pa} com adição de Cys, Glut ou anticorpos devido à natureza de isolante destes compostos (Figura 2b). A incubação do sensor com menor concentração de anticorpos (1: 5000 ou 1: 10000) ainda resultou em uma diminuição do I_{pa} em comparação com o imobilizado apenas com Cys e Glut (Fig. 2b). Isso significa que a imobilização do anticorpo na base sensora também ocorre nessas concentrações. Como o uso de menor concentração de anticorpos pode reduzir o custo de produção, escolhemos o 1: 5000 para a montagem do sensor. A imobilização do anticorpo na base sensora foi confirmada por Microscopia de Fluorescência Confocal. Uma intensa fluorescência foi observada no sensor de placa com imobilização do anticorpo (Figura 2e) quando comparado ao sensor sem imobilização (Figura 2c e d). Com relação aos dados do FTIR (Figura 8f) a imobilização do anticorpo foi confirmada pelo surgimento de bandas bem definidas em torno de 2093 cm^{-1} e 1352 cm^{-1} que poderiam ser atribuídas $\text{C}\equiv\text{N}$ e $\text{N}=\text{O}$ respectivamente. Avaliamos a

reprodutibilidade utilizando quatro imunossensores ZIKV-NS1 e observamos valores de Ipa muito semelhantes (coeficiente de variação de 4,5%) (Figura 2g).

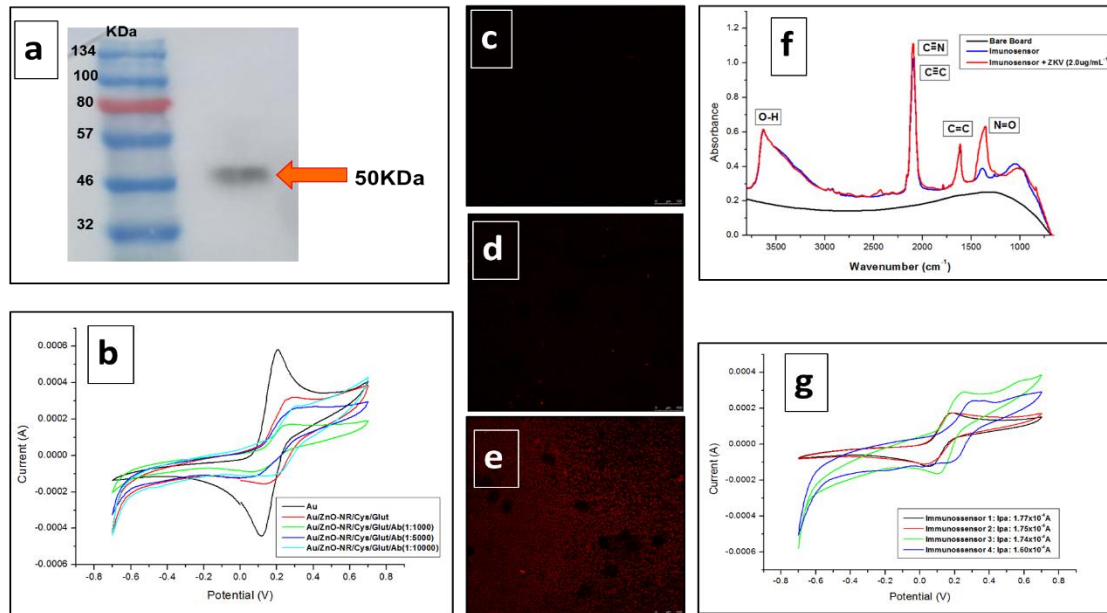


Figure 2 - a) Análise de Western blotting para ZIKV-NS1 evidenciando pureza da proteína, tamanho: 50kDa b) VCs obtidos em diferentes etapas do preparo do imunossensor. c-e) Micrografia sendo: c) base sensora sem GO/ZnO-NRs. d) Base sensora com GO/ZnO-NRs. e) base sensora com GO/ZnO-NRs + Ab. f) FTIR. g) VCs obtidos de diferentes imunossensores. Taxa de varredura: 100mV.s⁻¹

3.3 Caracterização do imunossensor para ZIKV-NS1

Aa curva de calibração do imunossensor foi realizada com eletrodos incubados em diferentes concentrações do ZIKV-NS1 e submetidos a análises de VC. Os resultados mostram que o Ipa aumenta com o aumento concentração de ZIKV-NS1 (Figura 3a). Foi obtida boa linearidade na curva de calibração na faixa de 0,1 ng.mL⁻¹ a 100 ng. mL⁻¹ ($r^2 = 0,9536$) (Figura 3b). Esta linearidade é adequada com testes ZIKV previamente autorizados pelo Food and Drug Administration. O Limite de Detecção é inferior a 1pg.mL⁻¹ (Figura 3c), indicando que o nosso imunossensor baseado em NBs-ZnO é um bom teste rápido para a detecção da zika em fase inicial.

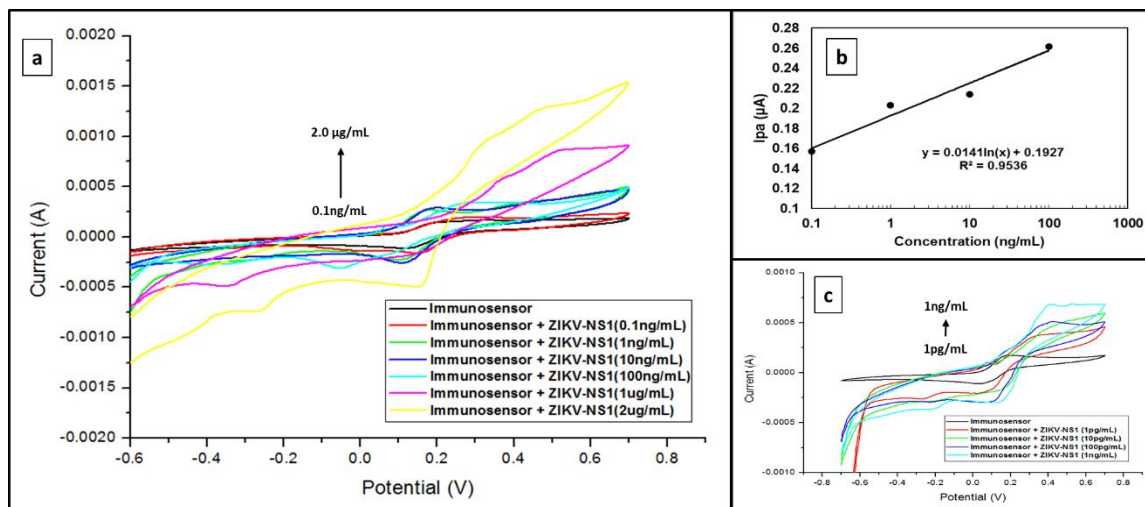


Figura 3- a) VCs obtidos de imunossensores incubados com diferentes concentrações de ZIKV-NS1. b) Linearidade da curva de calibração ($r^2=0.9536$). c) VCs de imunossensores incubados com ZIKV-NS1 para determinação de LoD

3.4 Especificidade do imunossensor ZIKV-NS1

A especificidade do nosso imunossensor ZIKV-NS1 foi testada pela avaliação de sua interação com o antígeno DENV-NS1 (Figura 4a). Curvas de VC apresentaram valores semelhantes de I_{pa} , ao do imunossensor sem incubação, mesmo na presença de alta concentração de DENV-NS1. Isso significa que o antígeno DENV-NS1 não se liga ao anticorpo anti-ZIKV-NS1, confirmando a especificidade do imunossensor. O ensaio de Dot-Blot utilizando os antígenos ZIKV-NS1 e DENV-NS1 incubados com anticorpo anti-ZIKV-NS1 (1:5000) (Figura 3b) corroborou com os resultados obtidos ao evidenciar a não reatividade do imunossensor ao antígeno da Dengue.

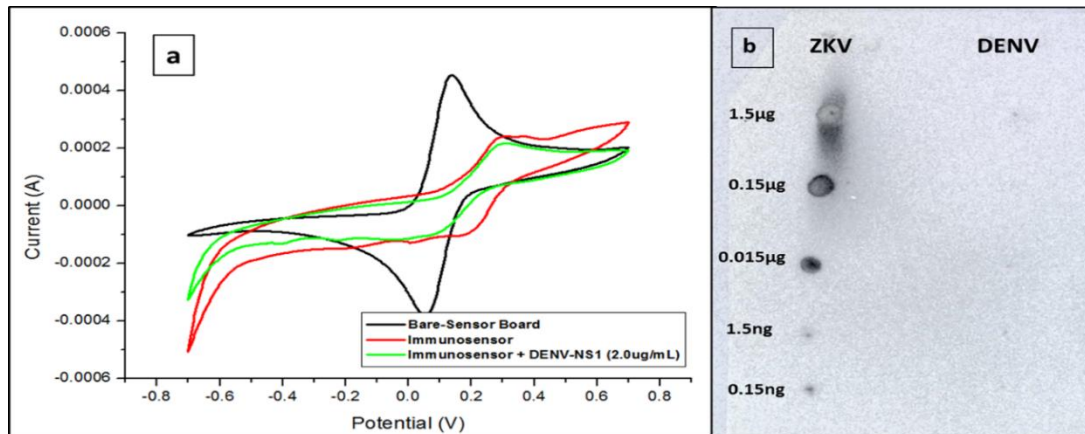


Figura 4 - a) VC de imunossensores na presença de DENV-NS1. Taxa de varredura $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. b) Dot blot de ZIKV-NS1 e DENV-NS1 em diferentes concentrações incubados com anticorpo anti-ZIKV-NS1

5.2.5 Análise imunossensor ZIKV-NS1 em Urina

Para confirmar se a ligação anticorpo-antígeno permanece nas amostras de urina, realizamos o ensaio Western blotting (Figura 5a). Quatro amostras foram preparadas, sendo utilizado 200ng de proteína: Antígeno em PBS, Antígeno em urina diluída em PBS (1:10), Antígeno em urina não diluída e urina. Observamos uma única banda a 50KDa, evidenciando que não há interferência na ligação antígeno-anticorpo pelos demais compostos presentes na urina. As amostras de urina foram avaliadas por VC, através do método de adição padrão. Assumindo uma concentração nula de ZIKV-NS1 na amostra de urina, as curvas evidenciaram a detecção ZIKV-NS1 na urina sem interferência de seus compostos (Figura 5b).

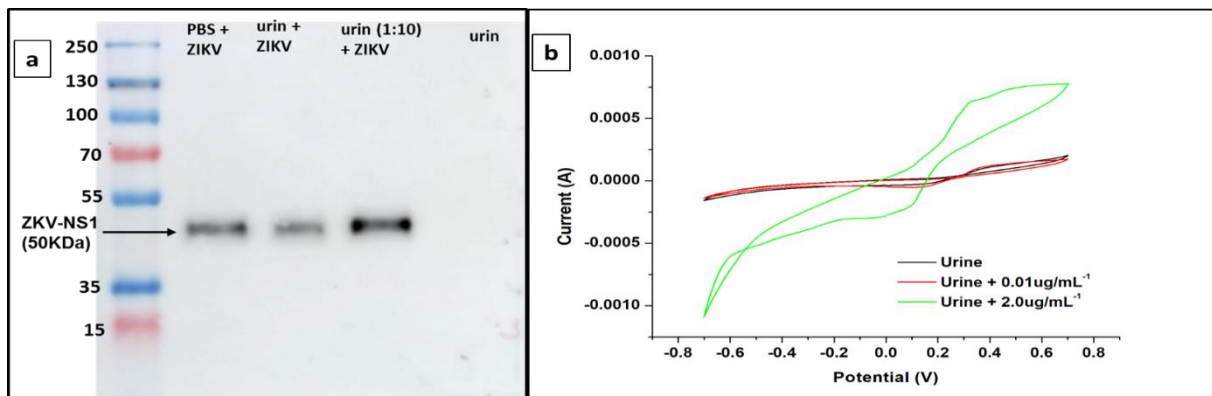


Figure 5 - a) Western blotting para avaliar a expressão de ZIKV-NS1 b) VC de imunossensores incubados com urina. Taxa de varredura $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$

6. Conclusão

Este trabalho conseguiu demonstrar o sucesso no desenvolvimento do imunossensor eletroquímico, para detecção de ZIK na urina, baseado em NBs-ZnO. O imunossensor apresentou especificidade para ZIKV-NS1, sem reatividade cruzada com DENV e baixo limite de detecção (1pg.mL^{-1}). A realização do teste em amostra de urina possibilita a que o imunossensor seja utilizado como teste rápido em Unidades de Pronto Atendimento, sem necessidade de laboratório ou mão de obra especializada. O imunossensor desenvolvido demonstrou estabilidade e reprodutibilidade adequada com outros testes de detecção de ZIKV. Deste modo, o imunossensor para ZIKV tem potencial significativo de melhora no diagnóstico precoce do ZIKV, incluindo áreas sem infraestruturas na área de saúde.

Referências

- AHSAHI, S., LERNER, M.B., GOLDSTEIN, J.M., LEE, J., TANG, X., BAGAROZZI JR., D.A., PAN, D., LOCASCIO, L., WALKERA, A., BARRON, F., BRETT, R., GOLDSMITH, B.R.** *Novel graphene-based biosensor for early detection of Zika virus infection. Biosensors and Bioelectronics.* Vol.100: p.85–88, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.051>
- ANNO, Y.; MAEKAWA, T.; TAMAKI, J.; ASANO, Y.; HAYASHI K.; YAMAZOE, N.** *Zinc-oxide-based semiconductor sensors for detecting acetone and capronaldehyde in the vapour of consomme'soup. Sensors and Actuators B: Chemical.* Vol.25, n.1–3, p.623–627, 1995. [https://doi.org/10.1016/0925-4005\(95\)85137-2](https://doi.org/10.1016/0925-4005(95)85137-2)
- BROWN, W.C., AKEY, D.L., KONWERSKI, J.R., TARRASCH, J.T., SKINIOTIS, G., KUHN, R.J., ET AL.** *Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure. Nat Struct Mol Biol.* Vol.23, n.9, p.865–867, 2016. DOI: 10.1038/nsmb.3268 PMID: 27455458
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC).** *Guidance for U.S. Laboratories Testing for ZIKV Infection.* Disponível em: <https://www.cdc.gov/zika/laboratories/lab-guidance.html>.
- SONG, H., QI, J., HAYWOOD, J., SHI, Y., GAO, G.F.** *Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. Nat Struct Mol Biol.* Vol. 23, n.5, p.456–458, 2016.
- GASPAROTTO, G., COSTA, J. P. C., COSTA, P. I., ZAGHETE, M. A., & MAZON, T.** *Electrochemical immunosensor based on ZnO nanorods-Au nanoparticles nanohybrids for ovarian cancer antigen CA-125 detection. Materials Science and Engineering C.* Vol.76, p.1240–1247, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.031>
- GONZALEZ-CHAVARRI, J.; PARELLADA-MONREALIRENE, L.; CASTRO-HURTADO, I.; ENRIQUE CASTAÑO, E.; MANDAYO, G.G.** *ZnO nanoneedles grown on chip for selective NO₂ detection indoors. Sensors and Actuators B: Chemical.* Vol.255, p1244–1253, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.08.094>
- RUI, Q., KOMORI, K., TIAN, Y., LIU, H., LUO, Y., SAKAI, Y.** *Electrochemical biosensor for the detection of H₂O₂ from living cancer cells based on ZnO nanosheets. Analytica Chimica Acta.* Vol.670, p.57–62, 2010.
- SASSOLAS, A., BLUM, L.J., LECA-BOUVIER, B.D.** *Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. Biotechnol.Adv.* Vol.30:p489–571, 2012.
- SHARMA, S., BYRNE, H., O'KENNEDY, R.J.** *Antibodies and antibody-derived analytical biosensors. Essays in Biochemistry.* Vol.60, n.1,p.9–18, 2016.
- XU, X., SONG, H., QI, J., YUQIAN LIU, Y., WANG, H., SU, C., SHI, Y., GAO, G.** *Contribution of intertwined loop to membrane association revealed by Zika virus full-length NS1 structure. The EMBO Journal.* Vol.35,n.20,p.2170–2178, 2016. DOI 10.15252/embj.201695290.