



Nuevo electrodo epoxi-grafito para la detección de ADN. Aplicación en la detección del VIH-1

UNIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Departamento de Química Analítica; Facultad de Química. Universidad de La Habana, Cuba

Unidad ejecutora participante: Laboratorio de Investigaciones del sida del Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil (LISIDA)

AUTORES: Abel Ibrahim Balbín Tamayo¹, Laura Sofía López Riso², Ana Margarita Esteva Guas¹, Madeline Blanco de Armas²

Filiación: ¹Departamento de Química Analítica. Facultad de Química. Universidad de La Habana. ²Laboratorio de Investigaciones del Sida del Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil (LISIDA)

RE SUM EN

Desde 2014 el grupo de investigación que presenta esta propuesta realiza trabajos en el desarrollo de electrodos epoxi-grafitos. Este trabajo consistió en obtener un electrodo elaborado con una mezcla epoxi-grafito desarrollada en Cuba, cuya superficie es fácil de modificar para hacerla sensible a la hibridación del ADN, capaz de detectar una secuencia de ADN, con potencial aplicación en la detección de microorganismos y enfermedades genéticas. Por primera vez fue detectado el ADN proviral del VIH-1 en muestras clínicas por un método electroquímico empleando estos electrodos. En la presente propuesta se utilizó un material compuesto conductor que consta de epoxi-grafito modificado con óxido de grafeno para preparar un electrodo para la detección voltamétrica de la señal de oxidación de la guanina del oligonucleótido que codifica una región del ADN proviral de VIH-1 en muestras clínicas. Los resultados obtenidos mostraron la viabilidad del electrodo para la detección de biomarcadores de enfermedades víricas como el VIH-1. Este trabajo responde a una prioridad nacional establecida en el lineamiento 131 de la Política Económica y Social del Partido y la Revolución: sostener y desarrollar los resultados alcanzados en el campo de la biotecnología, la producción médico-farmacéutica, la industria del *software* y el proceso de informatización de la sociedad, las ciencias básicas, las ciencias naturales, los estudios y el empleo de las fuentes de energía renovables, las tecnologías sociales y educativas, la transferencia tecnológica industrial, la producción de equipos de tecnología avanzada, la nanotecnología y los servicios científicos y tecnológicos de alto valor agregado. Los resultados han sido divulgados en diferentes eventos en Cuba y en Brasil. Adicionalmente, esta investigación realiza una importante contribución a la formación de profesionales, lo que se evidencia en una tesis doctoral en Química y una de licenciatura en Química Analítica, ya defendidas, y una tesis de diploma y trabajo de curso en ejecución.

Palabras clave

electrodo; epoxi-grafito; ADN; detección; VIH-1

Se está investigando intensamente en los biosensores de ADN basados en electrodos de carbono. Los electrodos de carbono son particularmente atractivos para aplicaciones de detección debido a su bajo costo, amplia ventana de potencial de trabajo, buena conductividad eléctrica y corrientes de fondo relativamente bajas [1]. En los últimos años se ha prestado mucha atención al uso del grafito en materiales compuestos, aprovechando sus excepcionales propiedades mecánicas y eléctricas para el desarrollo de plataformas electroquímicas [2, 3]. En particular, los compuestos de grafito tienen una alta resistencia intrínseca y un tiempo de relajación muy bajo, dentro de la escala de tiempo de los procesos de electroquímica [4, 5]. Por tanto, existe un interés especial en el uso de estos electrodos de carbono para el desarrollo de sensores factibles para la detección de moléculas biológicamente relevantes, como el ADN de los virus.

El objetivo de este trabajo fue la detección de ADN en una muestra clínica con electrodos de grafito epoxi modificados para el desarrollo de biosensores para enfermedades virales de ADN. La preparación del electrodo compuesto incluyó el uso de grafito resina epoxi modificado con óxido de grafeno, para introducir los grupos carboxílicos necesarios para la posible unión covalente de especies biológicamente relevantes. Los electrodos se probaron utilizando ADN proviral de VIH-1 en muestras clínicas.

El método voltamétrico fue desarrollando usando un potencióstato Palm Sens (Palm Instruments BV) acoplado a una computadora administrada por el *software* para computadora Palm Sens y operando en el modo de onda cuadrada de análisis voltamétrico. El electrodo de trabajo de grafito-epoxi modificado con óxido de grafeno (EGIlog) se construyó siguiendo el trabajo de Balbin-Tamayo *et al.* el electrodo de Ag/AgCl (KCl sat) se usó como referencia y se usó un alambre de platino como el electrodo auxiliar.

El oligonucleótido para el gen gag H1Gag1584 biotinilado (secuencia 5'-AAA GAT TAA TCC TGG G-3', secuencia del gen gag, idénticas a las de la cepa de referencia ELI del banco de genes de Los Alamos, Cepa ELI, número de acceso de Genbank K03454), y oligonucleótidos complementarios, ADNc, secuencia 5'-CCCAGGATTATCCATCTTT-3') fue sintetizado por Exxtend Biotechnology Ltda (oligonucleótido-Biotina, Brasil).

El oligonucleótido biotinilado H1Gag1584 se inmovilizó en la superficie del electrodo de epoxi-grafito modificado, y mediante la estreptavidina se unió covalentemente a los grupos carboxílicos de superficie con enlaces peptídicos [3, 6]. El oligonucleótido biotinilado se unió a la estreptavidina unida a la superficie del electrodo de epoxi-grafito modificado con óxido de grafeno (EGIlog) mediante el mecanismo llave-cerradura. Luego se realizó la detección electroquímica de la se-

ñal de oxidación de guanina del oligonucleótido H1Gag1584. Este oligonucleótido empleado codifica una región del gen gag H1Gag1584 del VIH-1. Esta es una de las regiones más conservadas virus, es decir, que varía poco entre los grupos de VIH-1.

Preparación de muestras clínicas

El ADN de las células mononucleares de sangre periférica se extrajo de 100 μ L de sangre total mediante cromatografía de afinidad en columna con QIAmp DNA mini-Kit, Qiagen y QIAcube kit de extracción automatizada. Estas muestras se caracterizaron en el laboratorio de biología molecular de LISIDA, a través de su carga viral y su detección directa en sangre periférica mediante el sistema estándar para el diagnóstico *in vitro* COBAS® Ampliprep/COBAS® Taqman® HIV-1 prueba v2.0. La detección es de 20 copias mL⁻¹.

Las muestras corresponden a personas con seguimiento clínico y serológico, según lo establecido por el algoritmo para el diagnóstico de infección por VIH-1 en Cuba. Dos muestras con una carga viral de menos de 20 mL⁻¹ copias se utilizaron como control positivo bajo (<20 mL⁻¹ copias) y dos muestras. Carga viral alta (≥ 104 copias mL⁻¹ (RNA de mL⁻¹)), como control positivo alto y una muestra como Control negativo (0 copias mL⁻¹ (ARN mL⁻¹)).

La figura 1 muestra los voltamperogramas por onda cuadrada del electrodo EGIlog, EGIlog activado con NHS/EDC, EGIlog con estreptavidina unida covalentemente, EGIlog con el complejo de estreptavidina/H1Gag1584 biotinilado en el electrolito soporte (tampón fosfato a pH 6,9, 20 mmolL⁻¹). Para el electrodo EGIlog con el complejo de estreptavidina/H1Gag1584 biotinilado. Se muestra una señal potencial de 0,94 V, cercana al potencial de oxidación de la guanina [7].

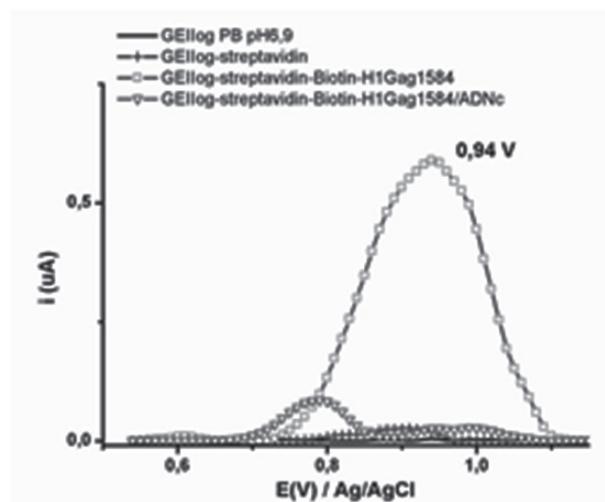


Fig. 1. Voltamperograma de onda cuadrada en tampón de fosfato a pH 6,9 del electrodo (EGIlog).

La detección de ADN proviral puede reducir el período de ventana posterior a la exposición a aproximadamente 11 días y, por lo tanto, también se puede usar para detectar el VIH-1 en individuos que aún no han montado una respuesta inmunitaria, o para resolver resultados serológicos indeterminados [8].

Los grupos carboxilo de los electrodos de epoxi-grafito modificados con óxido de grafeno permitieron la inmovilización del oligonucleótido biotina-H1Gag1584 en el electrodo por el mecanismo llave-cerradura entre el oligonucleótido biotinilado y la estreptavidina. Esta inmovilización evita la adsorción no específica, permite una buena configuración espacial del oligonucleótido y mejora la selectividad del electrodo [9]. Este es un elemento importante en la detección confiable y sensible del ADN proviral (analito) del VIH-1 a partir de la hibridación.

En el voltamperograma (figura 2) se puede observar una señal a 0,98 V asociada con la señal de oxidación de guanina de la cadena biotinilada H1Gag1584. La intensidad de corriente de la señal de 0,98 V que experimenta una disminución cuando el biosensor (electrodo con el oligonucleótido) entra en contacto con los controles positivos en condiciones de hibridación. Este comportamiento está relacionado con la formación de enlaces de hidrógeno entre las bases complementarias del oligonucleótido biotinilado y el ADN proviral, lo que causa una disminución en la densidad electrónica por la formación de estas interacciones [10, 11].

Una comparación inicial de las medias de las corrientes de oxidación pico con 10 mediciones, utilizando el cuadro de bigotes (figura 3), muestra que hay diferencias apreciables entre las medias de las corrientes máximas de control negativo y los controles positivos (alto y bajo) en 0,98 V.

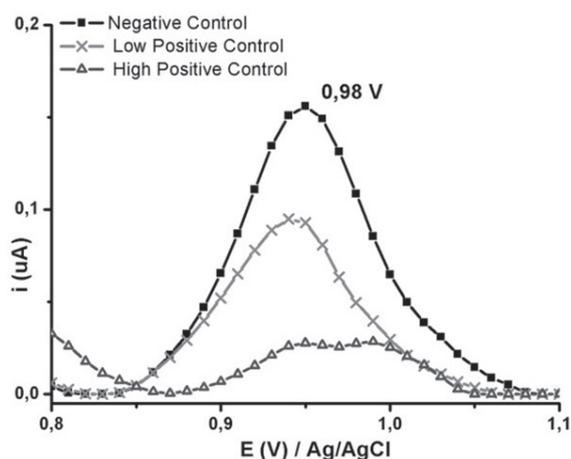


Fig. 2. Voltamperograma de onda cuadrada de control negativo, control positivo bajo y control positivo alto, en PB a pH 6,9, 20 mmolL⁻¹.

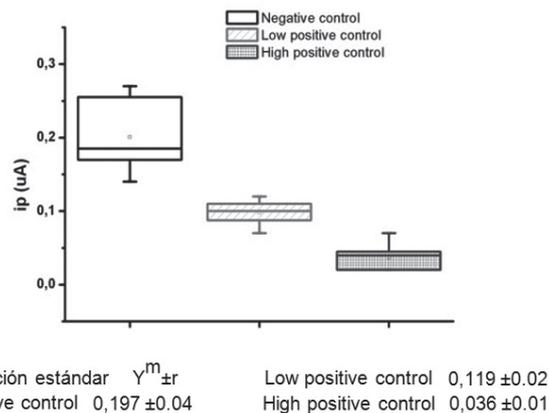


Fig. 3. Representación de la media y su desviación estándar ($\bar{Y}^m \pm r$) para la corriente máxima a 0,98 V. *Leyenda:* Desviación estándar: $\bar{Y}^m \pm r$; Negative control: 0,197 \pm 0,04; Low positive control: 0,119 \pm 0,02; High positive control: 0,036 \pm 0,01.

Aunque no se establece una correlación cuantitativa entre la carga viral y la cantidad de ADN proviral, se sabe que más de un virión puede infectar la misma célula, y más de una región de ADN proviral puede insertarse en el ADN cromosómico. A 0,98 V se observa una disminución marcada en la corriente máxima para los controles positivos altos (105 copias de ARN de mL⁻¹) porque hay una mayor hibridación que para el control positivo bajo (menos de 20 moléculas de ARN mL⁻¹).

La cantidad de ADN proviral detectable en muestras con alta carga viral puede estar condicionada por un mayor número de células infectadas, que pueden tener más de una región de ADN proviral integrada, lo que estaría de acuerdo con la marcada disminución de la señal para el positivo alto controlar. Mientras que las muestras tienen una carga viral baja (control positivo bajo), solo se debe a las regiones de ADN proviral en las pocas células infectadas. La disminución de la intensidad de la corriente de oxidación de guanina desde el oligonucleótido biotina-H1Gag1484 hasta el potencial de 0,98 V permitió la detección del ADN del VIH-1 proviral mediante voltamperometría de onda cuadrada en un tampón de fosfato pH 6,9.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la idoneidad de los electrodos compuestos de grafito-epoxi modificados con óxido de grafeno para el desarrollo de sensores electroquímicos de ADN. Estos electrodos compuestos ofrecen la posibilidad de obtener una respuesta electroquímica a concentraciones muy bajas de ADN único en la muestra clínica, y los grupos de unión requeridos en la superficie del electrodo para la inmovilización covalente de oligonucleótidos específicos.

Referencias bibliográficas

1. Ozsoz, M., Electrochemical DNA biosensors, T.F. Group, Editor. 2012.
2. Bojorge, N. and E. Alhadeff, Graphite-Composites Alternatives for Electrochemical Biosensor. Metal, Ceramic and Polymeric Composites for Various Uses. 2011.
3. Lucarelli, F., et al., Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors. Biosensors and Bioelectronics, 2004. 19(6): p. 515-530.
4. Céspedes, F. and S. Alegret, New materials for electrochemical sensing II. Rigid carbon-polymer biocomposites. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2000. 19(4): p. 276-285.
5. Bagotsky, V.S., Structure and Properties of Surface Layers, in Fundamentals of Electrochemistry. 2005, John Wiley & Sons, Inc. p. 147-180.
6. Ocaña, C. and M.d. Valle, A comparison of four protocols for the immobilization of an aptamer on graphite composite electrodes. Microchim Acta, 2014(181): p. 355-363.
7. Wang, J., Kawde A. N., Musameh M. Carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes for amplified label-free electrochemical detection of DNA hybridization. Analyst, 2003. 128(7): p. 912-916.
8. Collins, A., Laboratory User Handbook. Micropathology Ltd, 2010.
9. Pividori, M.I., A. Merkoçi, and S. Alegret, Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. Biosensors and Bioelectronics, 2000. 15(5-6): p. 291-303.
10. Erdem, A., Chapter 19 Genosensor technology for electrochemical sensing of nucleic acids by using different transducers, in Comprehensive Analytical Chemistry, S. Alegret and A. Merkoçi, Editors. 2007, Elsevier. pp. 403-411.
11. Paleček, E. and F. Jelen, Electrochemistry of Nucleic Acids, in Perspectives in Bioanalysis, F.S. Emil Paleček and J. Wang, Editors. 2005, Elsevier. pp. 73-173.

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA

Dr. C. Abel Ibrahim Balbin Tamayo. *Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de La Habana. Zapata y G, 10400, La Habana. Correo electrónico: ibrahim@fq.uh.cu*