

Uso da espectroscopia Raman amplificada por superfície na detecção do peptídeo P17-1 do HIV

DOI: 10.5281/zenodo.14010528

Pedro Henrique Carvalho Lima^{a*}

Human immunodeficiency virus (HIV) infection is a problem that affects millions of people every year. Currently, there are several forms of diagnosis, methods that have evolved and continue to evolve thanks to continuous technological developments. This text aims to analyze diagnostic tests performed based on the recognition of the p17-1 peptide, present in the p17 protein of HIV, using surface-enhanced Raman scattering (SERS).

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um problema que afeta milhões de pessoas todos os anos. Atualmente, existem diversas formas de diagnóstico, métodos estes que evoluíram e evoluem cada vez mais graças à contínua evolução tecnológica. Este texto visa analisar testes de diagnóstico realizados a partir do reconhecimento do peptídeo p17-1, presente na proteína

p17 do HIV, com a utilização do espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS).

^aUniversidade de Brasília (UnB). Campus Darcy Ribeiro. Instituto de Química (IQ/UnB).

*E-mail: phclima3101@gmail.com

Palavras-chave: HIV; espectroscopia Raman; diagnóstico; teste.

Recebido em 09 de setembro de 2024,

Aprovado em 15 outubro de 2024,

Publicado em 31 de outubro de 2024.

Introdução

Na década de 1980, surgiram as primeiras investigações sobre o causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), o HIV.¹ Desde então, é inegável que houve uma grande evolução no tratamento dessa doença e na pesquisa científica sobre o vírus. Atualmente, existem diversos métodos para diagnóstico da enfermidade. O mais utilizado, o teste ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), é muito eficiente e funciona a partir da detecção de anticorpos específicos no sangue humano.² No entanto, um novo tipo de teste vem sendo desenvolvido e se mostra promissor no diagnóstico do vírus.

O HIV pertence à subfamília dos *Lentiviridae*, sendo classificado como um retrovírus, ou seja, pertence a um grupo de vírus que possuem transcriptase reversa e têm RNA como material genético. Ele age atacando o sistema imunológico do hospedeiro, atingindo principalmente as células de linfócitos T CD4+. O vírus altera o DNA destas células e faz cópias de si mesmo, multiplicando-se até romper as células infectadas. Após isso, ele busca novas células saudáveis para repetir o processo, espalhando a infecção rapidamente.³

A proteína p17 desempenha um papel crucial nas fases iniciais da replicação viral do HIV, contribuindo para a pré-integração do complexo de DNA no núcleo das células hospedeiras. Além disso, ela está envolvida na ligação do

RNA viral, no transporte para a membrana plasmática e na incorporação do envelope do HIV-1 nos vírions, que são as partículas virais infecciosas completas.⁴ Em outras palavras, a p17 exerce uma função fundamental em diversos estágios da replicação, tanto na fase inicial quanto na fase final do ciclo de vida do vírus.⁵

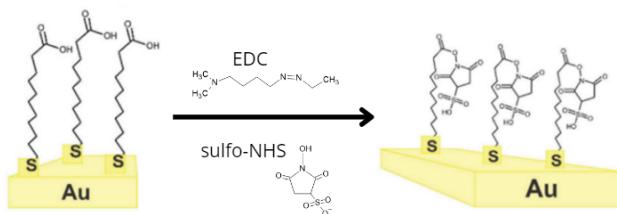
A espectroscopia Raman amplificada por superfície, ou SERS (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*), foi descoberta nos anos setenta e, até hoje, contribui em diversas áreas de pesquisa. A técnica consiste no aumento do espalhamento Raman em uma superfície metálica porosa e nanométrica.⁶ Utilizado na detecção de outras doenças, Carneiro e colaboradores propuseram a utilização dessa ferramenta analítica para detectar o peptídeo p17-1, importante estrutura presente na proteína p17 do vírus HIV.⁷

Metodologia

De modo geral, foram utilizados os reagentes descritos na Tabela 1. Primeiro, foram sintetizadas nanopartículas de ouro utilizando o método descrito por Turkevich. Foram diluídos 340 µL de uma solução aquosa de HAuCl₄ (ácido cloroaurico) a 10,1 mmol/L, que foi agitada e aquecida a 100 °C. Em seguida, adicionou-se rapidamente 5 mL de uma solução de citrato de sódio a 1%. A mistura foi agitada por mais uma hora, sob aquecimento.⁷

A próxima etapa do procedimento consistiu na modificação da superfície de filmes de ouro. Lâminas constituídas por uma camada de 100 nm de ouro, depositadas sobre uma camada adesiva de 5 nm de cromo, foram imersas por 24 horas em soluções etanólicas de 10 mmol/L de ácido 11-mercaptoundecanoico. Após isso, as lâminas foram lavadas minuciosamente com etanol e secas com nitrogênio ultrapuro. Na superfície das lâminas de ouro, foram utilizados 40 μ L de EDC a 20 mg/mL, seguidos de 40 μ L de sulfo-NHS a 55 mg/mL, para ativar o grupo funcional -COOH, como mostra a Figura 1. A mistura foi incubada por duas horas.⁷

Figura 1. Ativação do grupo funcional -COOH nas lâminas de ouro utilizando EDC e sulfo-NHS. Extraído da referência 7.



Após a ativação por EDC/sulfo-NHS, as lâminas modificadas foram enxaguadas e secas, após 6 horas de imersão em uma solução contendo 100 μ L de anti-p17 100 μ g/mL em PBS.⁷ Carneiro e colaboradores utilizaram o termo “plataforma de captura” para se referir à Figura 2, e o mesmo termo será utilizado nesta resenha.

Figura 2. Plataforma de captura. Extraído da referência 7.

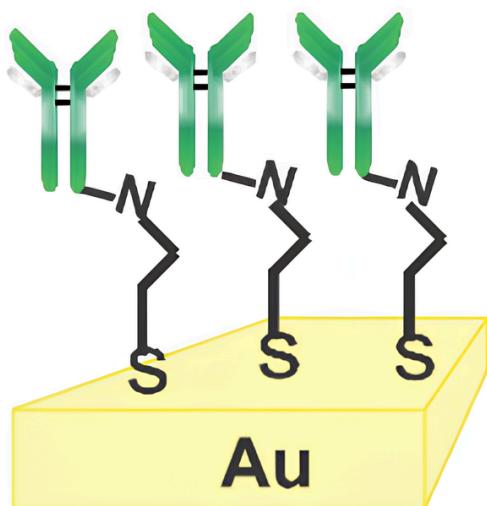
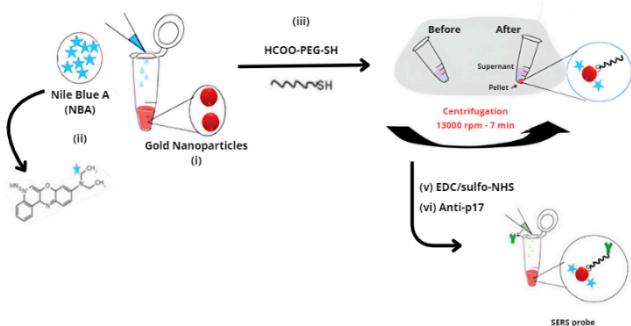


Tabela 1. Reagentes utilizados durante o processo experimental. Extraído da referência 7.

Reagente utilizados	
Reagente	Pureza/Massa molecular
Água ultrapura	-
MUA (ácido 11-mercaptoundecanoico)	$\geq 99\%$
Citrato de sódio dihidratado	$\geq 99\%$
Cloreto de ouro (III) trihidratado	$\geq 99,9\%$
Azul de Nilo A	95%
Etildimetilaminopropilcarbodiimida	-
Sulfo-N-Hidroxisuccinimida	-
HS-PEG-COOH	3000 Da
Anticorpo monoclonal IgG HIV p17	17 KDa
Peptídeo p17-1	$\geq 98\%$
Albumina de soro bovino	$\geq 96\%$

Na preparação das sondas, estas foram produzidas utilizando um método previamente implementado pelo grupo de Carneiro e colaboradores. 600 μ L de solução de Azul de Nilo A foi adicionada, gota a gota, em 1 mL de uma suspensão de nanopartículas de ouro (AuNPs) sob constante agitação. Após quinze minutos, adicionou-se 600 μ L de solução de HCOO-PEG-SH à suspensão, ainda sob agitação, mantendo-se assim por mais vinte minutos. O excesso de reagente foi removido centrifugando a suspensão por 7 minutos a 1300 rpm e as partículas modificadas resultantes foram ressuspensas em 1 mL de água ultrapura. Em seguida, 40 μ L de solução de EDC 20 mg/mL foi adicionada, seguida rapidamente por 40 μ L de solução de sulfo-NHS 55 mg/mL, com agitação por 30 minutos, para ativar os grupos -COOH na superfície das nanopartículas de ouro. Por fim, através da adição de 100 μ L de anti-p17 a 100 μ g/mL em PBS (com pH igual a 7,4) ao frasco de reação, o anti-p17 foi enxertado na superfície das AuNPs.⁷ Este processo está representado na Figura 3.

Figura 3. Preparação das sondas SERS. Extraído da referência 7.



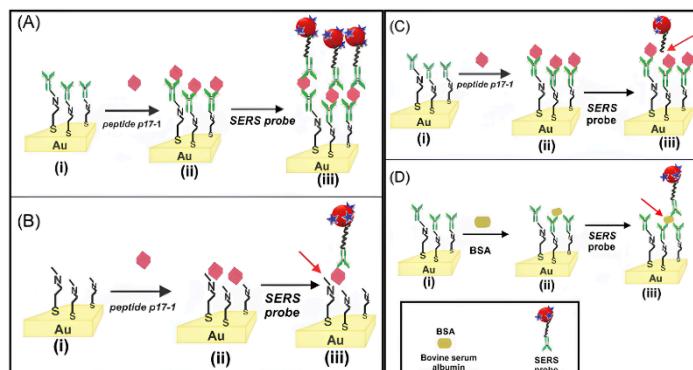
Para o protocolo de ensaio imunológico tipo sanduíche, as plataformas usadas para capturar o analito foram lavadas com água e depois incubadas novamente com 200 µL da suspensão de sondas SERS por 3 horas. Após todas serem lavadas e secas, com água ultrapura e nitrogênio, respectivamente, as amostras foram medidas. A Figuras 4 apresenta o ensaio principal e os controles do estudo. Nela, o proposto esquema do ensaio tipo sanduíche mostra que tanto a plataforma quanto as sondas SERS são modificadas com o anticorpo anti-p17 (A). Foram pipetados diretamente na plataforma de captura 200 µL do peptídeo p17-1 a 0,1 µmol/L em tampão PBS. Nos controles, o peptídeo é adicionado em uma plataforma sem anticorpo anti-p17 (B); na parte (C), as sondas SERS não possuem a proteína anti-p17. O mesmo procedimento descrito anteriormente para a adição de p17-1 foi seguido, mas sem a adição do peptídeo. Por fim, na divisão (D), a plataforma e as sondas são modificadas com anti-p17, mas é usado 200 µL da proteína BSA (0,1 µmol/L) em tampão PBS em vez do peptídeo p17-1. Nos experimentos representados na Figura 4, as plataformas foram incubadas com o analito (peptídeo) ou controle (BSA), à temperatura ambiente, por 2 horas.⁷

Os ensaios e controles foram medidos utilizando um procedimento chamado "mapeamento SERS": um laser de excitação escaneia a superfície da plataforma-alvo na direção x-y enquanto um espectro Raman (SERS) é obtido de cada ponto iluminado (pixel). Este procedimento foi utilizado com a intenção de quantificar a variabilidade espacial do ensaio com resultados confiáveis, pois experimentos deste tipo, com detecção em um único ponto, podem entregar intensidades que não são representativas.⁷

Diante desse procedimento, um laser de íon He-Ne (632,3 nm) foi utilizado para excitação. A resolução espacial

(tamanho do pixel) dos mapas SERS foi de 1 µm² e o tempo de exposição para cada espectro foi de 10 segundos. O sistema de imagem *Streamline PlusRaman* foi utilizado para alcançar uma varredura rápida, sem comprometer a relação sinal-ruído. Todo o processo de aquisição dos 13.000 espectros do mapa levou aproximadamente noventa minutos. A intensidade de um pico Raman a 595 cm⁻¹, característico da sonda Raman NBA, foi quantificada e plotada nos mapeamentos. O corante NBA tem absorção eletrônica a 632,8 nm, resultando em intensidades Raman com contribuições de Raman por ressonância e SERS. Este fenômeno é conhecido como SERRS (*Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering*) na literatura, mostrando dupla intensificação no espalhamento Raman. Os histogramas foram gerados a partir da análise dos mapas SERS e os tamanhos dos bins foram definidos com procedimento estatístico. Além disso, o teste d de Cohen foi usado para avaliar diferenças quantitativas entre controles e grupos experimentais.⁷

Figura 4. Preparação das sondas SERS e controles. Extraído da referência 7.



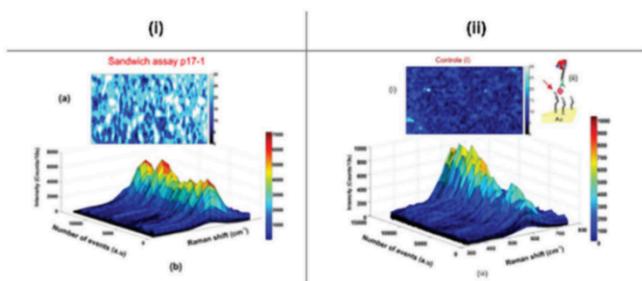
Por fim, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura Hitachi S-4800 para obter imagens de alta magnificação das sondas SERS em plataformas de captura. As imagens foram obtidas com voltagem de 1 kV e magnificação de 50.000 vezes.⁷

Resultados e discussões

A Figura 5 mostra uma comparação entre os mapas SERS para a detecção de 0,1 µmol/L do peptídeo p17-1 (4-A) e um controle (4-B). Os mapas foram obtidos em uma área de 100x100 µm² com um tamanho de passo de 1 µm. As cores representam a intensidade do pico mais forte em 595 cm⁻¹. A imagem 5-i mostra uma grande região do mapa coberta principalmente pela coloração azul clara, indicando alta intensidade de SERS, enquanto a imagem 5-i mostra mais

regiões azul escuro, representando menos sondas SERS, como esperado para um controle negativo. Porém, alguns pontos azul-claros estão presentes no controle (5-ii) e isso pode ser explicado devido a uma baixa incidência de ligação não específica. Espectros SERS individuais de diferentes pixels estão plotados nas figuras (5 i-ii), mostrando a variação espacial das intensidades SERS.⁷

Figura 5. Comparação entre os mapas SERS para a detecção do peptídeo p17-1. Extraído da referência 7.



A Figura 5(a) mostra uma distribuição mais uniforme das intensidades SERS, indicando maior cobertura de sondas, favorecida pela interação do peptídeo p17-1 com as espécies anti-p17 na superfície de captura e nas sondas SERS. Isso se traduz em um aumento da probabilidade de múltiplas sondas estarem na área iluminada pelo laser, embora ainda haja variação espacial nas intensidades SERS, causada por diferenças na química da superfície na plataforma de captura e variações entre as partículas nas sondas SERS. Outros grupos utilizam um ponto de laser maior para minimizar esta variação, mas isso pode reduzir a densidade de potência, o que não é um problema grave devido à força do sinal SERS.⁷

A Figura 6 evidencia que os controles apresentam consistentemente uma cobertura menor de sondas SERS do que o ensaio com p17-1, confirmando os resultados observados no mapeamento SERS da Figura 5.⁷ Os resultados SERS da Figura 5 também foram confirmados pelas imagens MEV na Figura 7, que mostram uma distribuição mais uniforme de sondas SERS no ensaio, em contraste com a distribuição expressa nos controles.

O teste *d* de Cohen confirmou uma mudança estatisticamente significativa entre o ensaio sanduíche (para a

detecção de p17-1) e o controle (i), definido na figura 4, com um valor de *d* de 2,5. Resultados semelhantes foram obtidos para os controles ii e iii. Cada média foi calculada a partir de cerca de 13.600 espectros no mapeamento do pico SERS da sonda NBA em 595 cm⁻¹. O ensaio foi facilmente distinguido dos controles, indicando a detecção bem-sucedida do peptídeo p17-1. Os controles negativos mostraram um fundo semelhante, resultante da ligação não específica, como ressaltado anteriormente.⁷

Figura 6. Média das sondas SERS por unidade de área. Extraído da referência 7.

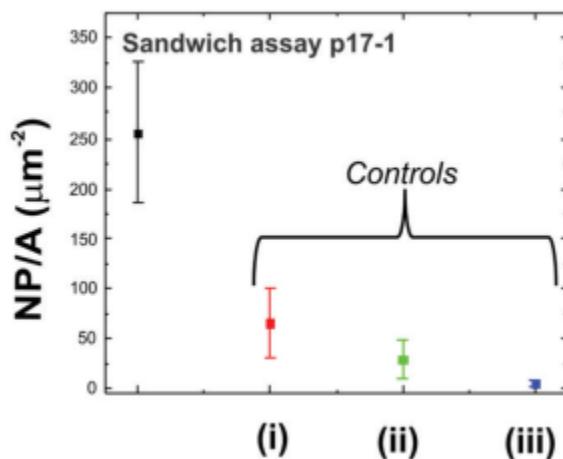
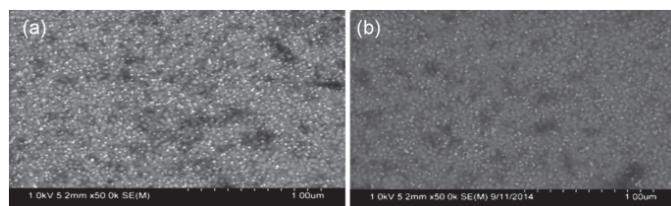


Figura 7. Imagens feitas pelo MEV. Extraído da referência 7.



Conclusões

Conclui-se que, levando em conta os resultados apresentados por Carneiro e colaboradores, o ensaio imunológico tipo sanduíche baseado em SERS demonstrou ser uma ferramenta eficaz para a detecção do peptídeo p17-1, presente na proteína p17 do HIV e peça fundamental no ciclo de vida do retrovírus. A abordagem de mapeamento SERS

permitiu a visualização detalhada da distribuição das sondas SERS e evidenciou uma maior cobertura e intensidades mais elevadas no ensaio, em comparação com os controles, o que confirma a eficiência da captura do peptídeo-alvo. Apesar de que a presença de ligação não específica tenha diminuído o limite de detecção, avanços científicos na química de superfície podem solucionar este problema e contribuir para a melhoria do procedimento.

O método SERS apresentou vantagens importantes em relação a técnicas mais conhecidas e tradicionais, como o teste ELISA, como tempos de análise reduzidos e a capacidade de fornecer resultados reproduutíveis e estatisticamente significativos. Mesmo com o limite de detecção do SERS ainda acima dos métodos convencionais, o nível detectado de 40,8 ng/mL é compatível com concentrações clinicamente relevantes do peptídeo p17-1. Este estudo prova o potencial dessa técnica para futuras aplicações no diagnóstico de HIV, com espaço para aprimoramentos que poderão aumentar sua sensibilidade e aplicabilidade a outros tipos de amostras biológicas.

Contribuições por Autor

O artigo e a inclusão de algumas observações são de Pedro Henrique Carvalho Lima.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesses.

Agradecimentos

Ao grupo PET-Química/IQ/UnB/MEC, à Secretaria de Educação Superior do Ministério da Educação (SeSU/MEC) e ao Decanato de Ensino de Graduação (DEG/UnB) pelo apoio ao Programa de Educação Tutorial pela bolsa concedida. Ao Instituto de Química (IQ/UnB) e à Universidade de Brasília pelo suporte e espaço fornecidos.

Notas e referências

- 1 I. Fernandes and M. Alves De Toledo Bruns, Revisão Sistematizada Da Literatura Científica Nacional Acerca Da História Do Hiv/Aids, *Revista Brasileira de Sexualidade Humana*, 2021, **32**, 60–67.
- 2 Métodos diagnósticos de HIV, <https://www.farmacia.ufmg.br/pensandonisso/metodos-diagnosticos-de-hiv/>, (acessado em 5 de setembro de 2024).
- 3 Aids/HIV, <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/aids-hiv/aids-hiv>, (acessado em 5 de setembro de 2024).
- 4 A. D. S. D. Silva, E. O. Delatorre, L. A. A. Leon, S. S. D. D. Azevedo, T. C. N. F. Leite and V. S. D. Paula, *Tópicos em Virologia*, Editora Fiocruz, 2023, 29–45.
- 5 Repositório Institucional Unesp, <https://repositorio.unesp.br/bitstreams/bbf342f2-1345-4a7e-a18c-1103cb1fe638/download>, (acessado em 5 de setembro de 2024).
- 6 D. L. A. D. Faria, M. L. A. Temperini e O. Sala, Vinte anos de efeito SERS, *Química Nova*, 1999, **22**, 541–552.
- 7 L. Carneiro, M. Moraes, S. Ribeiro e A. Brolo, Detection Of The Peptide P17-1 (Hiv) By Surface Enhance Raman Scattering (Sers), *Química Nova*, 2019, **42**, 1038–104