

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
CURSO DE DOUTORADO EM QUÍMICA – ASSOCIAÇÃO AMPLA
UEL/UEPG/UNICENTRO

DHÉSMON LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS VISANDO A
DETECÇÃO DE BIOMARCADORES RELACIONADOS AO CARCINOMA DE
CÓRTEX ADRENAL PEDIÁTRICO E À DOENÇA DE ALZHEIMER**

PONTA GROSSA

2020

DHÉSMON LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS VISANDO A
DETECÇÃO DE BIOMARCADORES RELACIONADOS AO CARCINOMA DE
CÓRTEX ADRENAL PEDIÁTRICO E À DOENÇA DE ALZHEIMER**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Química na Universidade Estadual de Ponta Grossa , área
de concentração: Química Inorgânica.

Orientadora: Prof. Dr^a. Christiana Andrade Pessoa
Coorientadora: Prof. Dr^a. Juliana Inaba

PONTA GROSSA

2020

L732 Lima, Dhésmon

Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos visando a detecção de biomarcadores relacionados ao carcinoma de córtex adrenal pediátrico e à doença de Alzheimer / Dhésmon Lima. Ponta Grossa, 2020. 145 f.

Tese (Doutorado em Química - Área de Concentração: Química), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Christiana Andrade Pessoa.
Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Inaba.

1. Imunossensor. 2. Biossensor de DNA. 3. Nanopartículas de ouro. 4. Carcinoma de córtex adrenal. 5. Doença de Alzheimer. I. Pessoa, Christiana Andrade. II. Inaba, Juliana. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Química. IV.T.

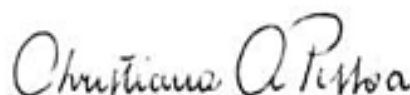
CDD: 614

TERMO DE APROVAÇÃO

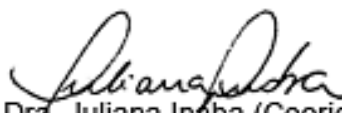
DHÉSMON LIMA

“DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS VISANDO A DETECÇÃO DE BIOMARCADORES RELACIONADOS AO CARCINOMA DE CÓRTEX ADRENAL PEDIÁTRICO E À DOENÇA DE ALZHEIMER”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química (Associação UEL/UEPG/UNICENTRO) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.



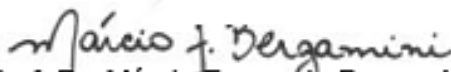
Profa. Dra. Christiana Andrade Pessoa (Orientadora)
UEPG/PR



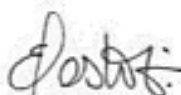
Profa. Dra. Juliana Inaba (Coorientadora)
UEPG/PR



Prof. Dr. Andreelson Wellington Rinaldi
UEM/PR



Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini
UFPR/PR



Profa. Dra. Eryza Guimarães de Castro
UNICENTRO/PR



Profa. Dra. Josiane de Fatima Padilha de Paula
UEPG/PR

Ponta Grossa, 06 de abril de 2020.

À minha esposa, Ana Carolina, e à minha mãe, Sônia.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu grandioso Deus e à minha querida Mãe, Nossa Senhora, que fazem todas as coisas serem possíveis, e que me abençoam sem cessar. Obrigado pela caminhada até aqui, e por serem a Luz que continuará a guiar todos os meus passos.

Meus sinceros agradecimentos à minha amada esposa, Ana Carolina, cujo apoio e amor incondicionais me fortaleceram e incentivaram em incontáveis momentos. Obrigado por estar sempre ao meu lado e por me fazer experimentar a felicidade todos os dias.

Agradeço à minha querida família, especialmente aos meus pais, Sônia e Luiz Cezar, à minha irmã Adriana e aos meus sobrinhos Jéssyka e Jean, por todo o amor, paz e segurança que encontrei em vocês em todas as ocasiões. Agradeço também aos meus sogros, Maria Alice e Orestes, por todo o apoio e incentivo dados a mim, os quais contribuíram muito para que eu chegasse até aqui.

Agradeço à professora Dr^a. Christiana A. Pessôa, pela orientação e todos os ensinamentos ao longo destes onze anos, que incluíram doutorado, mestrado e iniciação científica. Obrigado também à minha co-orientadora, professora Dr^a. Juliana Inaba, por todos os seus conselhos e conhecimentos a mim passados (sobretudo os bioquímicos!). Agradeço o apoio constante e a amizade de vocês duas, a qual tenho certeza de que durará para sempre!

Obrigado aos meus incríveis amigos, Giselle, Ellen, Luma, Cleverson, Marinês, Cristiane, Luana e Bianca, pela amizade eterna que construímos e por tantas conversas descontraídas no laboratório. Agradeço à professora Dr^a. Karen Wohnrath por sua presença, atenção e colaboração constantes, sempre muito disposta a ajudar no que fosse necessário e à minha coorientadora dos tempos de iniciação científica, professora Dr^a. Cliciane Guadalupe de Jesus, por sua amizade e todos os ensinamentos que me ajudaram a construir uma base científica sólida e que me permitiram chegar até aqui. Obrigado também a todos os demais integrantes do GDEM, pela convivência, ajuda e apoio que recebi de vocês em todos os momentos.

Aos meus eternos amigos de graduação, Rafael, Douglas e Tanna, e de infância, Eduarda e Renato, obrigado pela amizade de sempre, que nem o tempo nem a distância conseguem apagar.

Ao professor Dr. Kagan Kerman, da Universidade de Toronto Scarborough (UTSC), obrigado por ter me recebido tão bem em seu laboratório e pelos meses de trabalho durante meu período de doutorado sanduíche. Obrigado também aos meus amigos Maryam, Celia, Piryanka, Hanlin, Aruna, Anthony, Keith e Keuna pela amizade, apoio e companheirismo tão presentes desde meu primeiro dia em Toronto.

Obrigado às professoras Dr^a. Juliana de Moura, Dr^a. Larissa Alvarenga, Dr^a. Rafaela Fogaça e ao professor Dr. Bonald Figueiredo, pelos ensinamentos, discussões e amostras fornecidas para o desenvolvimento do imunossensor para carcinoma de córtex adrenal.

À CAPES, obrigado pela bolsa de estudos mensal e pela bolsa concedida por meio do programa PDSE, as quais possibilitaram a realização de todas as atividades reportadas na presente tese.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da UEPG (C-labmu) pela disponibilidade e realização das muitas análises que possibilitaram o desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Agradeço também ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) pelas análises de microscopia eletrônica de transmissão.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, que constitui a base de toda minha formação científica, construída ao longo dos últimos onze anos, e que me capacitará a enfrentar, com coragem e determinação, os desafios que aparecerem pelo caminho. Obrigado também ao Programa de Doutorado Associado em Química, e ao professor Dr. Sérgio Toshio Fujiwara (*in memoriam*), pela assistência e disponibilidade constantes durante os anos de doutorado.

Por fim, quero agradecer a todos aqueles que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a execução deste trabalho e me apoiaram durante estes quatro anos de doutorado, contribuindo para o meu aprendizado e crescimento pessoal. A todos vocês, muito obrigado!

“É como está escrito:
coisas que os olhos não viram,
nem os ouvidos ouviram,
nem o coração humano imaginou,
tais são os bens que Deus tem
preparado para aqueles que O amam.”
(1 Cor 2, 9)

RESUMO

A presente tese descreve a preparação, caracterização e potenciais aplicações de biossensores eletroquímicos à base de materiais carbonáceos e inorgânicos. Imunossensores baseados em nanopartículas de ouro funcionalizadas com L-arginina (AuNPs-ARG) foram aplicados na detecção *label-free* do hormônio sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), um biomarcador de carcinoma de córtex adrenal (CCA). O CCA é uma neoplasia rara e de natureza agressiva, caracterizada pela superprodução de DHEAS, e cujos casos pediátricos ocorrem na região Sul do Brasil em níveis acima da média mundial. A plataforma foi construída a partir da modificação de eletrodos de carbono vítreo oxidados com as AuNPs-ARG, e subsequente ligação de anticorpos monoclonais IgM anti-DHEA. As AuNPs-ARG foram obtidas por redução do complexo $[\text{AuCl}_4]^-$ com D-glucose na presença de ARG, e caracterizadas por espectroscopia UV-VIS, FTIR, MET, DLS, potencial zeta e DRX. Os imunossensores foram caracterizados por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), e sua construção foi otimizada por meio de planejamentos fatoriais e metodologia de superfície de resposta. A detecção de DHEAS foi realizada por EIE, a partir da variação percentual da resistência à transferência de carga (ΔR_{ct}) relativa ao marcador eletroquímico $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, após imunoensaios na presença do hormônio. Uma relação linear entre a ΔR_{ct} e a concentração de DHEAS foi verificada na faixa de 10,0 a 110,0 $\mu\text{g dL}^{-1}$, com um limite de detecção igual a 7,4 $\mu\text{g dL}^{-1}$. Além da boa sensibilidade, o imunossensor apresentou exatidão, especificidade e estabilidade durante o período de um mês. O dispositivo foi eficazmente aplicado na análise de amostras de plasma de pacientes, fornecendo resultados equivalentes ao método de quimioluminescência ($p > 0,05$). Além dos imunossensores descritos, biossensores baseados em eletrodos de ouro (AuE) modificados com sequências de DNA foram desenvolvidos para a detecção de eventos de interação com três isoformas de apolipoproteína E (ApoE2, ApoE3 e ApoE4), as quais relacionam-se com o desenvolvimento da doença de Alzheimer (DALz) em pacientes idosos. Os oligonucleotídeos empregados consistiram nas sequências promotoras denominadas CLEAR (associada com a expressão de proteínas envolvidas em processos de autofagia celular) e SIRT1 (relacionada com a expressão da proteína neuroprotetora sirtuína-1 (Sirt1)), e foram separadamente imobilizados sobre o AuE na forma de monocamadas auto-organizadas mistas com 6-mercaptopexanol. A interação de tais promotores sobretudo com a ApoE4 tem sido apontada como um dos eventos que pode contribuir para o desenvolvimento da DALz, a partir de falhas em mecanismos celulares autofágicos e na expressão da proteína Sirt1, favorecendo a deposição cerebral de agregados proteicos tóxicos que levam progressivamente à demência, como placas senis do peptídeo β -amiloide e emaranhados neurofibrilares de formas hiperfosforiladas da proteína tau. Os biossensores foram caracterizados por voltametria de pulso diferencial (VPD), VC, EIE e cronocoulometria, na presença do marcador redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$. As interações dos oligonucleotídeos com as isoformas de ApoE foram avaliadas por VPD e EIE, a partir de variações percentuais na corrente de pico catódico e na R_{ct} após incubação dos biossensores na presença de cada isoforma. Verificou-se que a sequência SIRT1 apresentou uma maior afinidade com a ApoE4 em comparação à ApoE2 e ApoE3, enquanto que a sequência CLEAR interagiu especificamente com a ApoE4, comprovando possíveis efeitos repressores desta isoforma na expressão de proteínas envolvidas em mecanismos celulares neuroprotetores, o que pode favorecer o início da DALz. Assim, os resultados obtidos na presente tese evidenciaram aplicações promissoras dos biossensores desenvolvidos como ferramentas para diagnóstico clínico de ACC e para a avaliação de interações proteína-DNA envolvidas na DALz.

Palavras-chave: imunossensor; biossensor de DNA; nanopartículas de ouro; carcinoma de córtex adrenal; doença de Alzheimer.

ABSTRACT

The present thesis describes the preparation, characterization and potential applications of electrochemical biosensors based on carbonaceous and inorganic materials. Immunosensors based on L-arginine-functionalized gold nanoparticles (AuNPs-ARG) were applied in the label-free detection of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), a biomarker of adrenocortical carcinoma (ACC). ACC is a rare and aggressive malignancy which is characterized by the overproduction of DHEAS, and whose incidence among children from Southern Brazil is above the global average. The sensing platform was prepared by modifying oxidized glassy carbon electrodes with AuNPs-ARG, and the subsequent attachment of IgM anti-DHEA monoclonal antibodies. AuNPs-ARG were obtained by the reduction of $[\text{AuCl}_4]^-$ precursor complex with D-glucose in the presence of ARG, and characterized by UV-VIS and FTIR spectroscopies, TEM, DLS, zeta potential determination and XRD. The immunosensors were characterized by using cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS), and their construction was optimized by factorial design and response surface methodology. DHEAS detection was performed by using EIS, considering the percentage variation in charge transfer resistance parameter (ΔR_{ct}) relative to the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redox marker, after immunoassays in the presence of the hormone. A linear relationship between ΔR_{ct} and DHEAS concentration was verified in the range of 10.0 to 110.0 $\mu\text{g dL}^{-1}$, with a detection limit of 7.4 $\mu\text{g dL}^{-1}$. Besides the good sensitivity, the developed immunosensor showed accuracy, specificity and stability for one month. The proposed device was successfully applied in the analysis of real patient plasma samples, with results that were comparable to the reference chemiluminescence assay ($p > 0.05$). Besides the presented immunosensors, biosensors based on gold electrodes (AuE) modified with DNA sequences were developed aiming the detection of interaction events with three apolipoprotein E isoforms (ApoE2, ApoE3, and ApoE4), which are related to the occurrence of late-onset Alzheimer's disease (AlzD) in the elderly. The employed oligonucleotides consisted of two thiolated promoter sequences, named CLEAR (associated to the expression of proteins involved in cellular autophagy processes) and SIRT1 (related to the expression of the neuroprotective protein sirtuin-1 (Sirt1)), which were separately immobilized on the AuE as mixed self-assembled monolayers with 6-mercaptohexanol. The interaction of such promoters with ApoE4 has been considered one of the events that can contribute to the occurrence of AlzD, as a result of failures in cellular autophagic mechanisms and in the expression of Sirt1 protein, which favors the brain accumulation of toxic protein aggregates that progressively lead to dementia, such as senile plaques of amyloid- β peptide and neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated forms of tau protein. The biosensors were characterized by using differential pulse voltammetry (DPV), CV, EIS and cronocoulometry, in the presence of $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ redox marker. The interactions of ApoE isoforms with the immobilized oligonucleotides were evaluated by DPV and EIS, considering the percentage variations in the cathodic peak current and in the R_{ct} parameter after incubating the biosensors in the presence of each ApoE isoform. It was verified that SIRT1 sequence showed a greater affinity to ApoE4 compared to ApoE2 and ApoE3, whereas CLEAR oligonucleotide interacted specifically to ApoE4. These behaviors suggested the existence of possible repressive effects of this isoform on the expression of proteins involved in cellular neuroprotective mechanisms, which can favor the onset of AlzD. Hence, the results obtained in the present thesis evidenced promising applications of the developed devices as efficient tools for clinical diagnosis of ACC and for the evaluation of protein-DNA interactions involved AlzD.

Keywords: immunosensor; DNA biosensor; gold nanoparticles; adrenocortical carcinoma; Alzheimer's disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	– Funcionamento de um biossensor eletroquímico.	23
Figura 1.2	– Representação das etapas de desenvolvimento e progressão de um tumor, com ênfase para o diagnóstico precoce baseado na detecção de biomarcadores.	25
Figura 1.3	– (A) Estrutura geral e (B) modelo em fita para a IgG.	28
Figura 1.4	– (A) Representação do pentâmero de IgM, a forma de IgM presente na circulação sanguínea, com destaque para a cadeia J ao centro (as linhas amarelas representam as ligações dissulfeto formadas entre as unidades monoméricas). (B) Modelo estrutural obtido no trabalho de Czajkowsky e Shao (2009).	29
Figura 1.5	– (A) Estrutura de uma simples-fita de DNA, com destaque para a ligação fosfodiéster entre nucleotídeos sucessivos. (B) Modelo de Watson e Crick [65] para a estrutura do DNA. (C) Esqueleto covalente de uma cadeia de DNA, mostrando as estruturas das bases nitrogenadas e as interações do tipo ligação de hidrogênio entre as mesmas.	36
Figura 1.6	– Representação esquemática da imobilização de simples-fitas de DNA via adsorção sobre eletrodo modificado com filmes policatiônicos.	39
Figura 1.7	– Representação esquemática da imobilização de simples-fitas de DNA funcionalizadas com grupos -SH sobre eletrodo de ouro na forma de SAM mistas com MCH a partir da formação de ligações covalentes Au-S.	41
Figura 1.8	– Representação esquemática da imobilização de simples-fitas de DNA funcionalizadas com biotina sobre eletrodo modificado com estreptavidina.	43
Figura 1.9	– Princípio de funcionamento do biossensor reportado por Li e colaboradores [119] para a detecção da interação dos fatores de transcrição NF- κ B, SP6 RNA polimerase e HNF-4 α com sequências de DNA.	46
Figura 2.1	– (A) Posicionamento das glândulas adrenais na parte superior dos rins e (B) subdivisões internas em suas três regiões principais: cápsula, córtex e medula.	47
Figura 2.2	– Estrutura química do mitotano, o principal agente quimioterápico utilizado para o tratamento de CCA.	49
Figura 2.3	– Estrutura química da (A) dehidroepiandrosterona (DHEA) e do (B) sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), hormônios esteroides considerados biomarcadores de CCA.	51
Figura 2.4	– Princípio de funcionamento do biossensor reportado por Wang e colaboradores (2015) [160] para a determinação de DHEAS.	52

Figura 2.5	– Representação esquemática do processo de construção dos imunossensores para DHEAS, com a posterior formação dos imunocomplexos entre as moléculas de IgM e as moléculas do biomarcador.	57
Figura 2.6	– Etapas de desprotonação do aminoácido L-arginina.	60
Figura 2.7	– (A) Solução aquosa a 9 mmol L^{-1} do complexo $[\text{AuCl}_4]^-$, empregado como precursor metálico para síntese das AuNPs-ARG. (B) Suspensão de AuNPs-ARG, obtida empregando-se $[[\text{AuCl}_4]^-] = 2,25 \text{ mmol L}^{-1}$; $[\text{ARG}] = 100,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{D-glucose}] = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$	61
Figura 2.8	– Equação química simplificada do processo de oxidação do monossacarídeo D-glucose.	62
Figura 2.9	– Representação esquemática ideal das AuNPs-ARG.	62
Figura 2.10	– Espectros de absorção na região do UV-VIS da suspensão de AuNPs-ARG (obtida com $[\text{ARG}] = 100,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $[[\text{AuCl}_4]^-] = 2,25 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{GLU}] = 0,50 \text{ mol L}^{-1}$, logo após o término da síntese) e de soluções de ARG $100,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$	63
Figura 2.11	– Espectros de absorção na região do infravermelho de filmes <i>cast</i> de ARG ($100,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e das AuNPs-ARG sobre substratos de silício.	64
Figura 2.12	– Imagens das AuNPs-ARG obtidas por MET nas magnificações (A) 100000 e (B) histograma de distribuição de tamanho obtido a partir da contagem de 500 partículas.	65
Figura 2.13	– Variação no diâmetro hidrodinâmico das AuNPs-ARG durante o período de um ano.	67
Figura 2.14	– Difrátograma de raios X das AuNPs-PFR após liofilização, com atribuição dos picos observados.	67
Figura 2.15	– (A) Voltamogramas cíclicos e (B) diagramas de Nyquist obtidos a cada etapa durante a construção dos imunossensores para DHEAS, em meio de solução equimolar de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão PBS $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4).	68
Figura 2.16	– Mecanismo proposto para o processo de ativação química dos grupos carboxílicos da superfície oxidada do ECV pelos agentes de ligação EDC e NHS, seguido pela ligação ao nanocompósito AuNPs-ARG (para maior clareza, a estrutura das AuNPs-ARG foi representada parcialmente).	70
Figura 2.17	– Diagrama de Pareto para os efeitos padronizados resultantes da triagem das variáveis via planejamento fatorial completo 2^3 (95% de confiança).	74
Figura 2.18	– Interpretação geométrica do efeito de interação de segunda ordem $[\text{IgM}] \cdot \text{tempo}_{\text{inc}}$	74

Figura 2.19	– (A) Superfície de resposta e (B) gráfico de curvas de nível resultantes da otimização dos imunossensores para DHEAS, em função das variáveis [IgM] e tempo _{inc} (T mantida constante em 37 °C).	77
Figura 2.20	– Variações percentuais da R _{ct} (ΔR_{ct}) após a realização de imunoensaios com diferentes configurações do imunossensor na presença de 150 $\mu\text{g dL}^{-1}$ de DHEAS (n = 3).	79
Figura 2.21	– (A) Diagramas de Nyquist obtidos com o imunossensor ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM na presença de diferentes concentrações de DHEAS (0,0; 10,0; 20,0; 50,0; 70,0; 90,0; e 110,0 $\mu\text{g dL}^{-1}$) de DHEAS, em tampão PBS 0,15 mol L ⁻¹ pH 7,4 contendo 5,0 mmol L ⁻¹ de K ₄ [Fe(CN) ₆]/K ₃ [Fe(CN) ₆]. (B) Curva analítica obtida com o imunossensor para detecção de DHEAS (n = 3).	80
Figura 2.22	– Estruturas químicas da (A) DHEAS e de três possíveis interferentes esteroideais para o imunossensor desenvolvido: (B) TEST, (C) PROG e (D) COL.	82
Figura 2.23	– Variações percentuais na R _{ct} (ΔR_{ct}) obtidos por EIE com o imunossensor após imunoensaios na presença de DHEAS e dos interferentes PROG, TEST e COL.	83
Figura 2.24	– Variação nos valores de ΔR_{ct} obtidos para cinco imunossensores ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM independentes ao longo de 4 semanas de estocagem a 4 °C.	85
Figura 3.1	– Mecanismos de clivagem da PPA mediados pelas enzimas α -, β - e γ -secretase.	91
Figura 3.2	– Efeito da hiperfosforilação na atividade da pTau e formação de emaranhados neurofibrilares.	93
Figura 3.3	– Estruturas da (A) ApoE3 e da (B) ApoE4.	94
Figura 3.4	– (A) Estrutura da Sirt1. (B) Representação dos mecanismos neuroprotetores da Sirt1.	98
Figura 3.5	– Representação do processo de autofagia (macroautofagia).	99
Figura 3.6	– Representação esquemática do processo de modificação dos AuEs com as simples- e duplas-fitas dos oligonucleotídeos CLEAR e SIRT1, seguido por interação com as isoformas de ApoE.	104
Figura 3.7	– Voltamogramas de pulso diferencial (A e B) e diagramas de Nyquist (C e D) obtidos a cada etapa de modificação para o df-CLEAR/MCH/AuE (A e C) e o df-SIRT1/MCH/AuE (B e D) (eletrólito suporte: tampão PBS (pH 7.4) contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de [Ru(NH ₃) ₆]Cl ₃).	107
Figura 3.8	– Diagramas de Anson obtidos para o (A) sf-SIRT1/MCH/AuE, (B) sf-CLEAR/MCH/AuE e o MCH/AuE (controle) em tampão Tris 10 mmol L ⁻¹ pH 7,4 na presença (a e b) e na ausência (c e d) de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do marcador redox [Ru(NH ₃) ₆] ³⁺	110

Figura 3.9	– Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes valores de velocidade de varredura (de 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 125; 150; 175; 200; 250; 300; 400; 500; e 600 mV s ⁻¹) para o (A) df-SIRT1/MCH/AuE e (B) df-CLEAR/MCH/AuE. Relações de I_{pc} vs. v e de I_{pc} vs. $v^{1/2}$ para o df-SIRT1/MCH/AuE (C e E) e para o df-CLEAR/MCH/AuE (D e F) (eletrólito suporte: tampão PBS 0,15 mol L ⁻¹ em pH 7,4 contendo 50 μ mol L ⁻¹ [Ru(NH ₃) ₆]Cl ₃).	112
Figura 3.10	– Voltamogramas de pulso diferencial (A e B) e diagramas de Nyquist (C e D) obtidos no estudo de interação entre o sf-CLEAR/MCH/AuE ou df-CLEAR/MCH/AuE e ApoE4 (eletrólito suporte: tampão PBS 0,15 mol L ⁻¹ em pH 7,4 na presença de 50 μ mol L ⁻¹ de [Ru(NH ₃) ₆]Cl ₃).	114
Figura 3.11	– Voltamogramas de pulso diferencial (A e B) e diagramas de Nyquist (C e D) obtidos no estudo de interação entre o sf-SIRT1/MCH/AuE ou df-SIRT1/MCH/AuE e ApoE4 (eletrólito suporte: tampão PBS 0,15 mol L ⁻¹ em pH 7,4 na presença de 50 μ mol L ⁻¹ de [Ru(NH ₃) ₆]Cl ₃).	115
Figura 3.12	– Gráficos comparativos dos valores de ΔI_{pa} (A) e ΔR_{ct} (B) apresentados pelo df-SIRT1/MCH/AuE após incubação na presença de ApoE4, ApoE3 e ApoE2 (1 μ mol L ⁻¹ para cada proteína). AuEs modificados apenas com SAMs de MCH (MCH/AuE) e com SAMs mistas das sequências <i>scrambled</i> (SCR) com MCH (df-SCR/MCH/AuE) foram usados como controles (n = 3).	117
Figura 3.13	– Representação do modo de interação do motivo hélice-volta-hélice com o duplex de DNA.	118
Figura 3.14	– Gráficos comparativos dos valores de ΔI_{pa} (A) e ΔR_{ct} (B) apresentados pelo df-CLEAR/MCH/AuE após incubação na presença de ApoE4, ApoE3 e ApoE2 (1 μ mol L ⁻¹ para cada proteína). AuEs modificados apenas com uma SAM de MCH (MCH/AuE) e com SAMs mistas das sequências <i>scrambled</i> (SCR) com MCH (df-SCR/MCH/AuE) foram usados como controles (n = 3).	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	– Exemplos de biomarcadores e patologias associadas.	25
Tabela 2.1	– Valores dos níveis das variáveis empregados na triagem via planejamento fatorial 2^3 para otimização da construção dos imunossensores para DHEAS.	58
Tabela 2.2	– Valores dos níveis das variáveis empregados no planejamento fatorial 2^2 composto central para otimização da construção dos imunossensores para DHEAS.	58
Tabela 2.3	– Valores médios de I_{pa} , ΔE_p e R_{ct} obtidos por VC e EIE em cada etapa da construção dos imunossensores para detecção de DHEAS ($n = 3$).	69
Tabela 2.4	– Matriz experimental do planejamento fatorial 2^3 para triagem das variáveis envolvidas na preparação dos imunossensores e na realização dos imunoenaios para DHEAS ($150 \mu\text{g dL}^{-1}$).	73
Tabela 2.5	– Matriz experimental do planejamento fatorial 2^2 composto central empregado para otimização das condições de preparação do imunossensor para DHEAS ($150 \mu\text{g dL}^{-1}$).	76
Tabela 2.6	– Resultados da ANOVA do modelo quadrático obtido para a construção do imunossensor para DHEAS.	78
Tabela 2.7	– Faixas lineares e valores de LD reportados para a determinação de DHEAS empregando diferentes métodos analíticos.	81
Tabela 2.8	– Resultados do estudo de exatidão e precisão (reprodutibilidade) ($n = 3$ para cada concentração) para a detecção de DHEAS com o imunossensor impedimétrico ox-GCE/AuNPs-ARG/IgM.	84
Tabela 2.9	– Resultados para a detecção de DHEAS em amostras de plasma de pacientes obtidos por quimioluminescência e o imunossensor impedimétrico proposto.	86
Tabela 3.1	– Sequências dos oligonucleotídeos empregados neste trabalho.	102
Tabela 3.2	– Valores de I_{pc} e parâmetros eletroquímicos resultantes do ajuste dos dados de EIE ao circuito de Randles ($n = 3$), a cada etapa de modificação do AuE com os oligonucleotídeos SIRT1 e CLEAR. ...	108
Tabela 3.3	– Valores de ΔI_{pa} e ΔR_{ct} ($n = 3$) para os AuE modificados com as simples- e duplas-fitas dos oligonucleotídeos CLEAR e SIRT1 após incubação na presença de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ApoE4.	115
Tabela 3.4	– Valores de ΔI_{pa} e ΔR_{ct} obtidos para o df-SIRT1/MCH/AuE, df-SCR/MCH/AuE e MCH/AuE após incubação na presença de ApoE4, ApoE3 e ApoE2 ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$ para cada proteína).	117
Tabela 3.5	– Valores de ΔI_{pa} e ΔR_{ct} obtidos para o df-CLEAR/MCH/AuE, df-SCR/MCH/AuE e MCH/AuE após incubação na presença de ApoE4, ApoE3 e ApoE2 ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$ para cada proteína).	120

LISTA DE SIGLAS

AFP	Alfa-fetoproteína
ANOVA	Análise de variância
ApoE	Apolipoproteína E
APOE	Gene da Apolipoproteína E
ApoE2	Apolipoproteína E2
ApoE3	Apolipoproteína E3
ApoE4	Apolipoproteína E4
ARG	L-arginina
AuE	Eletrodo de ouro
AuNPs	Nanopartículas de ouro
AuNPs-ARG	Nanopartículas de ouro funcionalizadas com L-arginina
BSA	Albumina de soro bovino
CCA	Carcinoma de córtex adrenal
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CG-MS/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLEAR	Elemento de expressão e regulação lisossomal coordenada
COL	Colesterol
DAIz	Doença de Alzheimer
df-CLEAR	dupla-fita da sequência CLEAR
df-SIRT1	dupla-fita da sequência SIRT1
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHEAS	Sulfato de dehidroepiandrosterona
DLS	Espalhamento dinâmico da luz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração de raios X
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
ELISA	Ensaio imunossorvente ligado a enzima

FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
HPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
HSA	Albumina de soro humano
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
ITO	Óxido de estanho dopado com índio
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LD	Limite de detecção
MAPs	Proteínas associadas a microtúbulos
MCH	6-mercaptohexanol
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
NHS	<i>N</i> -hidróxi-succinimida
ox-ECV	Eletrodo de carbono vítreo oxidado
PPA	Proteína precursora de amiloide
PROG	Progesterona
PSA	Antígeno prostático específico
pTau	Proteína tau
SAM	Monocamadas auto-organizadas
sf-CLEAR	Simples-fita da sequência CLEAR
sf-SIRT1	Simples-fita da sequência SIRT1
SIRT1	Sequência promotora da transcrição do gene da sirtuína-1
Sirt1	Sirtuína-1
SPR	Ressonância <i>plasmon</i> de superfície
TEST	Testosterona
TFEB	Fator de transcrição EB
UV-VIS	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível
VC	Voltametria cíclica

VOQ

Voltametria de onda quadrada

VPD

Voltametria de pulso diferencial

β A

Peptídeos β -amiloide

LISTA DE SÍMBOLOS

ΔE_p	Separação entre potenciais de pico
ΔI_{pc}	Variação percentual da I_{pc}
ΔR_{ct}	Variação percentual da R_{ct}
C_{dl}	Capacitância da dupla camada elétrica
I_{pa}	Corrente de pico anódico
I_{pc}	Corrente de pico catódico
R_{ct}	Resistência à transferência de carga

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	21
CAPÍTULO 1 – BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS E POTENCIAIS APLICAÇÕES.....	23
1.1 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS & DETECÇÃO DE BIOMARCADORES.....	23
1.2 IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS.....	26
1.2.1 Nanopartículas de Ouro Aplicadas à Construção de Imunossensores Eletroquímicos.....	29
1.3 BIOSSENSORES DE DNA.....	34
1.3.1 Estratégias para Imobilização de Oligonucleotídeos em Superfícies Condutoras.....	37
1.3.1.1 Imobilização por adsorção.....	38
1.3.1.2 Imobilização por ligação covalente.....	39
1.3.1.3 Utilização do complexo estreptavidina-biotina.....	42
1.3.2 Métodos Analíticos para o Estudo de Interações Proteína-DNA.....	44
CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DE DHEAS, UM BIOMARCADOR DE CARCINOMA DE CÓRTEX ADRENAL PEDIÁTRICO.....	47
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	47
2.1.1 Carcinoma de Córtex Adrenal (CCA): Características Gerais.....	47
2.1.2 Métodos para Tratamento e Diagnóstico de CCA.....	48
2.2 OBJETIVOS.....	53
2.2.1 Objetivo Geral.....	53
2.2.2 Objetivos Específicos.....	53
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
2.3.1 Reagentes e Soluções.....	54
2.3.2 Síntese e Caracterização das AuNPs-ARG.....	54
2.3.3 Preparação dos Imunossensores Eletroquímicos para DHEAS.....	55
2.3.4 Otimização da Preparação dos Imunossensores e dos Imunoensaios para DHEAS.....	57
2.3.5 Curvas Analíticas e Determinação de DHEAS em Amostras Clínicas.....	59
2.3.6 Medidas Eletroquímicas.....	59
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60

2.4.1	Síntese e Caracterização das AuNPs-ARG.....	60
2.4.2	Caracterização Eletroquímica dos Imunossensores.....	68
2.4.3	Otimização da Preparação dos Imunossensores e da Realização dos Imunoensaios para DHEAS.....	71
2.4.3.1	Triagem das variáveis.....	72
2.4.3.2	Metodologia de superfície de resposta.....	75
2.4.4	Avaliação da Influência das AuNPs-ARG na Detecção de DHEAS.....	78
2.4.5	Curvas Analíticas.....	80
2.4.6	Estudo de Interferentes.....	82
2.4.7	Estudos de Exatidão e Precisão.....	84
2.4.8	Estudo da Estabilidade do Imunossensor.....	84
2.4.9	Determinação de DHEAS em Amostras Clínicas.....	85
2.5	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	86

CAPÍTULO 3 – DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE INTERAÇÕES ENTRE ISOFORMAS DE APOLIPOPROTEÍNA E E SEQUÊNCIAS DE DNA ASSOCIADAS À DOENÇA DE ALZHEIMER.....

3.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	88
3.1.1	Doença de Alzheimer (DAIz).....	88
3.1.2	Peptídeos e Proteínas Associados ao Desenvolvimento da DAIz.....	89
3.1.2.1	Peptídeos β A.....	89
3.1.2.2	Proteínas Tau (pTau).....	91
3.1.3	Apolipoproteína E & DAIz.....	93
3.1.3.1	ApoE4 & SIRT1.....	96
3.1.3.2	ApoE4 & CLEAR.....	99
3.2	OBJETIVOS.....	101
3.2.1	Objetivo Geral.....	101
3.2.2	Objetivos Específicos.....	101
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	102
3.3.1	Reagentes e Soluções.....	102
3.3.2	Modificação dos Eletrodos de Ouro.....	103
3.3.3	Medidas Eletroquímicas.....	104
3.3.4	Análise Estatística dos Dados Obtidos.....	104
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	105
3.4.1	Caracterização Eletroquímica dos Eletrodos Modificados.....	105

3.4.1.1	Estudo das etapas de modificação dos AuE.....	105
3.4.1.2	Estimativa do número de oligonucleotídeos imobilizados.....	108
3.4.1.3	Influência da velocidade de varredura de potencial.....	111
3.4.2	Estudos de Interação com Isoformas de ApoE.....	113
3.4.2.1	Interação da ApoE4 com as simples- ou duplas-fitas das sequências CLEAR e SIRT1.....	113
3.4.2.2	Interação dos oligonucleotídeos SIRT1 e CLEAR com as diferentes isoformas de ApoE.....	116
3.5	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	121
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES FINAIS & PERSPECTIVAS.....		123
4.1	CONCLUSÕES FINAIS.....	123
4.2	PERSPECTIVAS.....	124
REFERÊNCIAS.....		125

APRESENTAÇÃO

A determinação de analitos empregando sistemas baseados em biossensores eletroquímicos tem recebido considerável atenção nas últimas décadas, como consequência da demanda crescente por soluções analíticas que sejam economicamente viáveis, seletivas e sensíveis, e que possam ser aplicadas, por exemplo, no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e no estudo de interações entre biomoléculas. A ampla diversidade de técnicas para a preparação de tais sensores, bem como a existência de diferentes materiais modificadores que podem ser utilizados para este fim, fazem com que dispositivos cada vez mais sensíveis e sejam produzidos, maximizando seu potencial de utilização em sistemas bioanalíticos de detecção.

Considerando o avanço promissor na produção e aplicação de biossensores, a presente tese explora, ao longo de quatro capítulos, aspectos teóricos e experimentais referentes ao desenvolvimento de tais dispositivos e suas potenciais aplicações na detecção de analitos clinicamente relevantes e de eventos de interação entre biomoléculas envolvidos em processos patológicos. No Capítulo I, é apresentada uma introdução geral sobre os princípios e características fundamentais de biossensores eletroquímicos, com foco em imunossensores e biossensores de DNA. Destaca-se, de modo especial, imunossensores eletroquímicos construídos sobre plataformas baseadas em AuNPs, e também diferentes métodos para a imobilização de cadeias de DNA em superfícies condutoras.

O Capítulo II relata o desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico com potenciais aplicações na determinação do biomarcador sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), hormônio produzido pelas glândulas adrenais (suprarrenais) em níveis anormais durante a ocorrência de carcinoma de córtex adrenal (CCA), cuja incidência em crianças é particularmente alta na região Sul do Brasil. O dispositivo baseou-se na imobilização de anticorpos anti-DHEA sobre uma plataforma constituída por um eletrodo de carbono vítreo modificado com AuNPs funcionalizadas com o aminoácido L-arginina, e foi aplicado na detecção *label-free* de DHEAS como um método alternativo para auxiliar no diagnóstico precoce de CCA pediátrico.

O Capítulo III aborda o estudo eletroquímico de interações do tipo DNA-proteína relacionadas ao desenvolvimento da doença de Alzheimer (DAIz). Neste sentido, duas sequências de DNA (SIRT1 e CLEAR, relacionadas à expressão de proteínas envolvidas em mecanismos neuroprotetores e de autofagia celular, respectivamente) foram imobilizadas em eletrodos de ouro e suas interações com diferentes isoformas de apoliproteína E (ApoE2, ApoE3 e ApoE4) foram avaliadas por meio de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e

voltametria de pulso diferencial (VPD). Tais interações estão associadas a falhas em mecanismos bioquímicos celulares que podem desencadear o início da DAz em pacientes idosos.

Por fim, o Capítulo IV contém as conclusões finais do trabalho e perspectivas para estudos futuros.

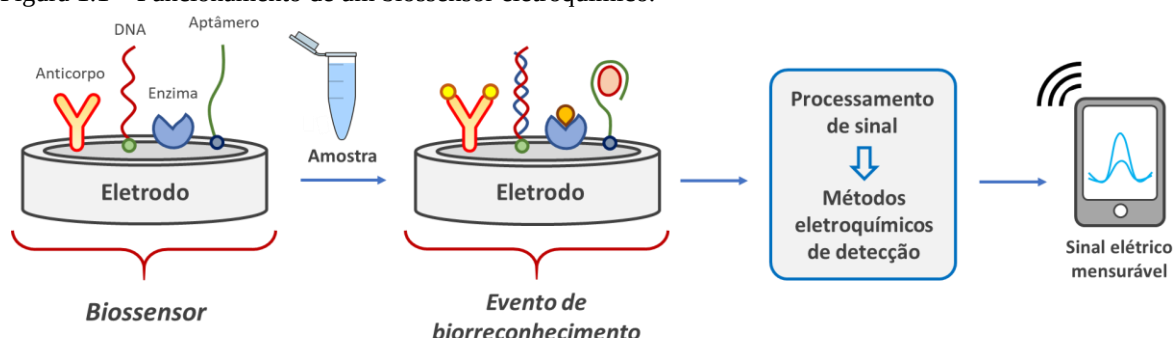
CAPÍTULO 1 – BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS E POTENCIAIS APLICAÇÕES

1.1 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS & DETECÇÃO DE BIOMARCADORES

A criação de novos sistemas para a detecção de analitos de importância biológica, ambiental e industrial têm despertado cada vez mais a atenção de pesquisadores de diversas áreas, os quais têm continuamente focado seus esforços para que dispositivos sensíveis, seletivos, economicamente viáveis e com alta potencialidade de aplicação possam ser desenvolvidos. Neste sentido, os sistemas de detecção baseados em biossensores eletroquímicos estão entre os mais estudados, devido a características como possibilidade de miniaturização, portabilidade, rapidez de resposta e especificidade de reconhecimento do analito [1].

Um biossensor típico apresenta duas unidades funcionais básicas: um biorreceptor (geralmente biomoléculas como enzimas, anticorpos ou ácidos nucleicos), responsável pelo reconhecimento seletivo do analito, e um transdutor físico-químico (eletroquímico, óptico ou piezoelétrico) responsável por fornecer uma resposta mensurável a partir do evento de interação entre o biorreceptor e seu respectivo alvo [2]. No caso específico de biossensores eletroquímicos, o transdutor onde as biomoléculas receptoras estão imobilizadas consiste em um eletrodo confeccionado a partir de um material condutor como ouro [3], óxidos metálicos [4] ou carbono [5] (Figura 1.1).

Figura 1.1 – Funcionamento de um biossensor eletroquímico.



Fonte: O autor.

Dependendo do tipo de sinal elétrico gerado pelo eletrodo como uma consequência do evento de biorreconhecimento que ocorre em sua superfície, os biossensores eletroquímicos podem ser classificados em amperométricos (quando a resposta medida é a corrente),

potenciométricos (medição da diferença de potencial entre o imunossensor e um eletrodo de referência), condutométricos (quando uma variação na condutância é registrada) ou impedimétricos (baseados na variação da impedância do sistema) [6,7].

O primeiro registro do desenvolvimento de um biossensor foi reportado por Clark e Lyons (1962) [8], e consistiu em um dispositivo para a determinação de glucose em amostras biológicas a partir da modificação de eletrodos com a enzima glucose oxidase. Desde então, progressos significativos têm levado ao desenvolvimento de sistemas inovadores envolvendo eletroquímica, nanotecnologia e bioeletrônica [9], com aplicações diversificadas na detecção de compostos de relevância industrial, ambiental e clínica.

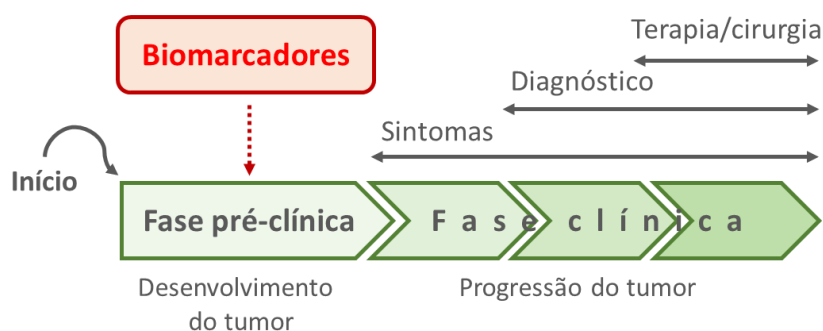
Particularmente, a aplicação de biossensores na determinação de biomoléculas de importância clínica – os chamados biomarcadores – tem sido considerada uma estratégia promissora para o diagnóstico e monitoramento de diversas enfermidades. De maneira geral, os biomarcadores consistem em grupos de indicadores moleculares (por exemplo, proteínas, peptídeos ou pequenos metabólitos orgânicos) que podem representar, direta ou indiretamente, o estado de saúde ou o grau de avanço de um determinado quadro patológico em um indivíduo [10,11]. Considerando que a concentração de biomarcadores no organismo é alterada durante processos biológicos anormais, seu monitoramento consiste em uma ferramenta útil para a realização de diagnósticos e prognósticos clínicos para uma série de desordens biológicas, como neoplasias e doenças infecciosas, neurológicas e cardíacas [10].

Exemplos de biomarcadores empregados no diagnóstico e monitoramento de quadros patológicos são as proteínas BRCA1, CA 125, CEA (relacionadas ao câncer de mama), AFP (associada ao câncer de fígado), PSA (marcador de câncer de próstata), A β ₁₋₄₂ (relacionada à doença de Alzheimer), troponinas (associadas ao infarto agudo do miocárdio), entre outras (Tabela 1.1). Na maior parte dos casos, o desequilíbrio na concentração dos biomarcadores pode ocorrer já nas fases iniciais das referidas enfermidades, durante a denominada fase pré-clínica (como representado para o câncer na Figura 1.2). Assim, a detecção de tais indicadores moleculares pode contribuir para o diagnóstico precoce das enfermidades às quais estão relacionados, muitas vezes antes mesmo dos sintomas surgirem. Desta forma, as possibilidades de tratamento e a taxa de sobrevivência dos indivíduos afetados pode ser aumentada [12,13].

Tabela 1.1 – Exemplos de biomarcadores e patologias associadas.

Biomarcadores	Doença associada	Referência
BRCA1; BRCA2; CA 15-3; CA 125; CEA	Câncer de mama	[14]
CEA; CA 19-9; SCC; NY-ESO-1	Câncer de pulmão	[14]
AFP; CEA	Câncer de fígado	[14]
Tirosinase; NY-ESO-1	Melanoma	[14]
CA 125; HCG; CEA; CA 549	Câncer de ovário	[14]
PSA	Câncer de próstata	[14]
βA_{1-42} ; βA_{1-40}	Doença de Alzheimer	[15]
α -sinucleína	Doença de Parkinson	[15]
[Cu-Zn]-superóxido dismutase	Esclerose lateral amiotrófica	[16]
Príons	Encefalopatia espongiforme bovina (doença da “vaca louca”)	[15]
Troponina T; troponina I	Infarto agudo do miocárdio	[17]

Figura 1.2 – Representação das etapas de desenvolvimento e progressão de um tumor, com ênfase para o diagnóstico precoce baseado na detecção de biomarcadores.



Fonte: Adaptado da referência [12].

A detecção de biomarcadores consiste em um tópico desafiador, uma vez que os mesmos costumam estar presentes em concentrações traço no organismo. Portanto, sua identificação requer a utilização de métodos que sejam ultrasensíveis, seletivos e que permitam detectar quantitativamente suas concentrações [10]. As técnicas de detecção de biomarcadores baseadas em imunoenaios consistem em testes bioquímicos que permitem o reconhecimento molecular altamente específico entre anticorpos e antígenos [18]. Entre tais técnicas encontra-se o ensaio imunossorvente ligado a enzima (*enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA),

os fluoroimunoensaios, os imunoensaios por quimioluminescência e os radioimunoensaios [10].

Apesar dos métodos acima mencionados possuírem especificidade, sensibilidade e precisão, algumas desvantagens estão associadas. Entre elas, pode-se citar o alto consumo de tempo, detecção indireta do analito, utilização de biomoléculas conjugadas a enzimas ou marcadas com isótopos radioativos (sistemas que não são *label-free*), emprego de equipamentos de custo elevado e utilização de reagentes e solventes tóxicos. Somado a isso, a sensibilidade apresentada por estes sistemas pode não ser suficiente para o monitoramento de baixas concentrações de biomarcadores de modo a permitir um diagnóstico precoce da doença associada, o qual é essencial para a tomada de decisão de tratamento e para um melhor prognóstico [18]. Assim, ganha importância o desenvolvimento de novos sistemas de detecção que possuam um baixo custo, possibilitem análises rápidas, e que sejam ao mesmo tempo sensíveis e seletivos [19].

Neste sentido, os biossensores eletroquímicos, sobretudo os imunossensores e biossensores de DNA, têm despertado um crescente interesse na comunidade científica como dispositivos analíticos eficazes para a detecção de biomarcadores, consistindo em alternativas viáveis aos métodos tradicionais mencionados. Além disso, o grande volume de trabalhos desenvolvidos atualmente na área [20–26] têm consistentemente reforçado o promissor potencial de aplicação de tais sensores no âmbito clínico, principalmente no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e no estudo de interações entre biomoléculas envolvidas em patologias diversas.

1.2 IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Devido à sua conhecida e elevada especificidade de ligação a seu antígeno correspondente, anticorpos são comumente explorados e aplicados no desenvolvimento de biossensores para a detecção e quantificação de analitos como patógenos, proteínas, hormônios, toxinas e outros analitos. Tais dispositivos – conhecidos como imunossensores ou sensores imunológicos – baseiam-se diretamente no evento de reconhecimento e formação do complexo antígeno-anticorpo (ou imunocomplexo) na superfície do transdutor e cuja ocorrência é evidenciada pela geração ou variação de sinal do sistema empregado [27].

Os imunossensores eletroquímicos combinam a elevada especificidade da reação imunológica com vantagens técnicas como a alta sensibilidade e praticidade, aliadas a um menor custo [12,14]. O emprego de tais sistemas possibilita o desenvolvimento de métodos do

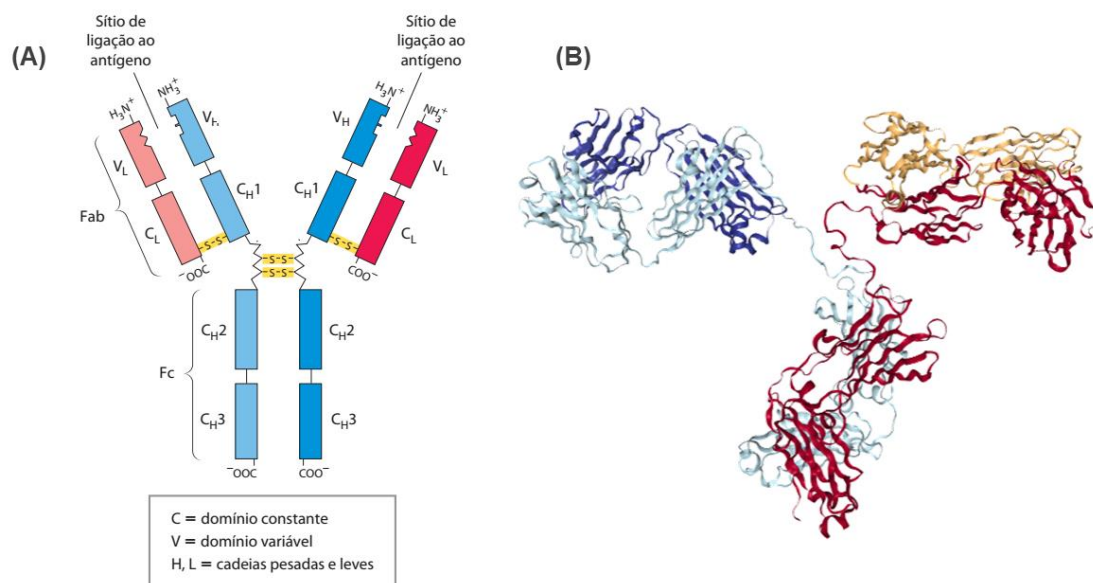
tipo *label-free*, em que a detecção do analito é realizada sem a utilização de anticorpos conjugados a enzimas ou a marcadores fluorescentes [28], o que pode diminuir o número de etapas, o tempo total e o custo das análises [29].

Outras características vantajosas a respeito dos imunossensores relacionam-se à sua portabilidade, resposta rápida e consumo de pequenas quantidades de amostra, as quais, somadas à possibilidade de miniaturização e detecção *in situ* e em tempo real, permitem que tais dispositivos sejam promissores para aplicação em sistemas de detecção do tipo *point-of-care*. Tais sistemas permitem para detecção de diferentes tipos de analitos em amostras biológicas *in loco*, podendo ser utilizados em locais distantes de laboratórios de análises clínicas ou centros de saúde, como nos consultórios médicos e até mesmo na residência do paciente) [14,30,31].

No centro da resposta gerada pelos imunossensores estão os anticorpos, os quais consistem em proteínas solúveis conhecidas também como imunoglobulinas (Ig), e que estão diretamente envolvidas na resposta imune corporal. No organismo, sua principal função consiste no reconhecimento e ligação a antígenos, os quais podem consistir em bactérias, vírus, fungos ou moléculas estranhas ao organismo, conduzindo-os posteriormente para sua destruição. Os anticorpos são produzidos por glóbulos brancos especializados, os linfócitos B (ou células B), e constituem cerca de 20% do total de proteínas sanguíneas [32].

As imunoglobulinas classificam-se em IgA, IgD, IgE e IgM e IgG, as quais diferenciam-se pelo número de domínios e massa molecular das cadeias polipeptídicas que as formam, bem como pela sua função em diferentes tipos e estágios da resposta imune [33]. Entre estas, as IgG constituem a principal classe, e são constituídas por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias pesadas e duas cadeias leves (diferenciadas de acordo com seus tamanhos), as quais são unidas por interações não covalentes e ligações dissulfeto, e arranjadas espacialmente em uma conformação em formato de “Y” (Figura 1.3). As cadeias pesadas (denominadas como cadeias γ) interagem entre si em uma das extremidades (porção conhecida como fragmento basal ou Fc), e então se ramificam para interagir separadamente com as cadeias leves (formando os fragmentos conhecidos como porções Fab, os quais contêm os sítios de ligação ao antígeno) (Figura 1.3). As IgG possuem três domínios constantes em cada cadeia pesada (C_H) e um em cada cadeia leve (C_L). As cadeias pesadas e as leves contêm também um domínio variável na porção Fab de cada uma delas (V_H e V_L , respectivamente), cuja variabilidade da sequência de aminoácidos é a responsável pela interação específica com o respectivo antígeno (Figura 1.3) [32,34,35].

Figura 1.3 – (A) Estrutura geral e (B) modelo em fita para a IgG.

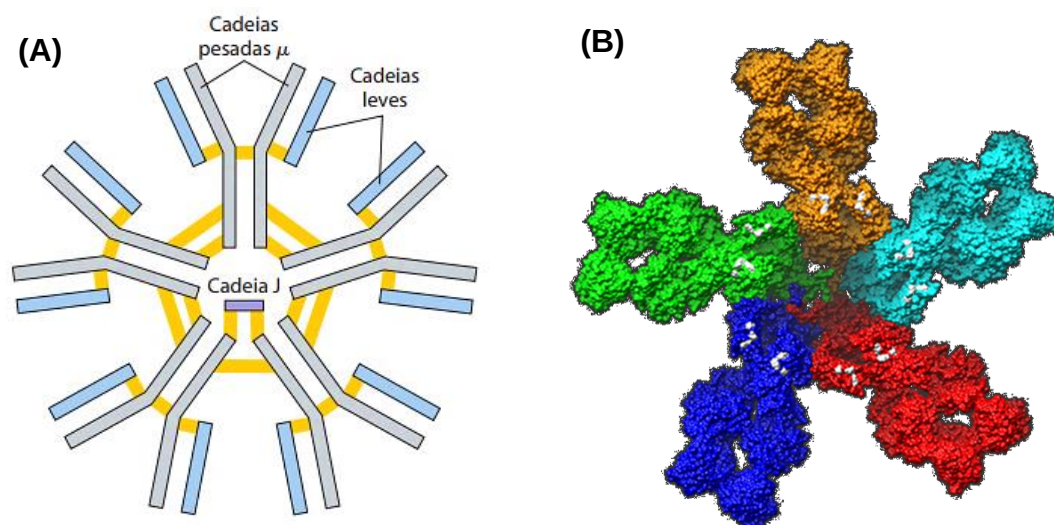


Fonte: (A) Adaptado da referência [32]. (B) Referência [36].

As imunoglobulinas M (IgM) podem ocorrer tanto como um monômero, a forma de ligação à membrana dos linfócitos B, quanto como forma secretada e circulante que consiste em um pentâmero da sua estrutura básica (Figura 1.4). A IgM é o primeiro anticorpo a ser produzido pelas células B em resposta à presença de um antígeno e o principal nos estágios iniciais de uma resposta imune [32,37].

Assim como outros anticorpos, os monômeros de IgM são constituídos por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. Entretanto, diferentemente da maioria dos anticorpos, que apresentam suas cadeias pesadas constituídas por três domínios constantes (como mencionado anteriormente para a IgG), as cadeias pesadas da IgM possuem um domínio constante a mais, e são denominadas cadeias μ [38]. A estrutura pentamérica da IgM é mantida unida por meio do estabelecimento de ligações dissulfeto entre as unidades monoméricas e também pela presença de um pequeno polipeptídeo central, denominado cadeia J (*joining chain*) (Figura 1.4A). Embora sua estrutura cristalina ainda não tenha sido determinada, estudos conduzidos por Czajkowsky e Shao (2009) [38] demonstraram que o pentâmero de IgM apresenta uma configuração espacial em formato de cogumelo, com a região central em saliência (Figura 1.4B).

Figura 1.4 – (A) Representação do pentâmero de IgM, a forma de IgM presente na circulação sanguínea, com destaque para a cadeia J ao centro (as linhas amarelas representam as ligações dissulfeto formadas entre as unidades monoméricas). (B) Modelo estrutural obtido no trabalho de Czajkowsky e Shao (2009) [38].



Fonte: Referências (A) [32] e (B) [38].

Como já mencionado, os anticorpos são reconhecidos por suas altas especificidades de ligação aos seus respectivos antígenos, de forma similar às enzimas. Assim, cada imunoglobulina é capaz de se ligar de modo altamente seletivo a uma determinada estrutura química, distinguindo-a de todas as outras. Estima-se que os humanos tenham a capacidade de produzir mais de 10^8 anticorpos diferentes com diferentes especificidades de ligação, as quais são determinadas pela natureza dos resíduos de aminoácidos nos domínios variáveis de suas cadeias pesadas e leves. O complexo antígeno-anticorpo formado após o evento de reconhecimento é altamente estável, como uma consequência da elevada força de interação entre a imunoglobulina e seu respectivo antígeno (constante de dissociação K_d da ordem de 10^{-10} , correspondente a energias de ligação de cerca de 65 kJ mol^{-1}). Esta força é derivada das várias interações de van der Waals, iônicas e de ligação de hidrogênio que se estabelecem quando um antígeno interage com uma molécula de anticorpo [32].

1.2.1 Nanopartículas de Ouro Aplicadas à Construção de Imunossensores Eletroquímicos

Na maior parte dos casos, o sinal gerado pelo evento de reconhecimento entre os antígenos e os anticorpos que ocorre na superfície de imunossensores eletroquímicos pode ser amplificado por meio da co-imobilização de materiais nanoestruturados como grafeno, nanotubos de carbono, *quantum dots* e nanopartículas metálicas. Além da amplificação de sinal, a utilização de nanomateriais na construção de imunossensores pode auxiliar na imobilização

dos elementos de reconhecimento como consequência da sua elevada área superficial [10]. Desta maneira, o emprego de tais componentes costuma aperfeiçoar a eficiência do processo de transdução, aumentando assim a sensibilidade do dispositivo [10].

Especificamente, é frequente o emprego de nanopartículas metálicas (ou de óxidos metálicos) diretamente ou na forma de nanocompósitos para a construção de imunossensores eletroquímicos altamente sensíveis e seletivos para a detecção *in vitro* de uma ampla variedade de biomarcadores para diagnóstico de câncer [39–41] e de doenças neurológicas [3,42,43], infecciosas [44–46] e cardiovasculares [47–49]. Particularmente, as características únicas apresentadas pelo ouro na forma nanoestruturada (AuNPs) fazem com que tais nanopartículas estejam entre as mais empregadas para o desenvolvimento de imunossensores, devido a propriedades como facilidade de preparação, biocompatibilidade, possibilidade de funcionalização, elevada condutividade elétrica e alta área superficial específica [50].

A biocompatibilidade característica das AuNPs consiste em uma de suas propriedades mais marcantes para o desenvolvimento de imunossensores. Sua interação com biomoléculas pode ocorrer, por exemplo, por meio de interações eletrostáticas, forças de van der Waals ou ainda ligação covalente a grupos específicos, permitindo que este nanomaterial seja explorado como uma eficiente plataforma de imobilização para anticorpos, antígenos e outras proteínas sem que os mesmos percam sua bioatividade [10,50–52]. Como consequência das vantagens mencionadas, diferentes estratégias utilizando nanopartículas metálicas (principalmente AuNPs) e seus compósitos com outros nanomateriais (como nanotubos de carbono e grafeno) têm sido desenvolvidas para aplicação no desenvolvimento de novos imunossensores eletroquímicos. Como exemplos de tais estratégias, pode-se citar a modificação de superfícies condutoras com nanopartículas via procedimento *drop-coating*, eletrodeposição e ainda associação às conhecidas monocamadas auto-organizadas (SAM) [53–60].

Devido à sua praticidade e simplicidade, a deposição direta de nanopartículas e nanocompósitos sobre superfícies condutoras via procedimento *drop-coating* para imobilização de anticorpos tem sido frequentemente utilizada para a construção de imunossensores. Nesta perspectiva, Wang e colaboradores (2016) [53] propuseram um imunossensor para a detecção do antígeno carcinoembrionário (CEA), glicoproteína cuja superprodução está associada à ocorrência de vários tipos de tumores, principalmente aos de cólon. O imunossensor foi baseado na deposição via *drop-coating* de AuNPs estabilizadas em citrato sobre um eletrodo de carbono vítreo (ECV), seguido pela imobilização direta de anticorpos primários anti-CEA sobre as mesmas. Após incubação em solução contendo o biomarcador CEA, os eletrodos foram incubados em uma dispersão dos anticorpos secundários anti-CEA, os quais foram previamente

conjugados a um nanocompósito constituído por nanopartículas de prata e nanofios de óxido de cobre(I). Por meio do monitoramento da corrente de redução de uma concentração fixa de H_2O_2 (processo catalisado pela presença do nanocompósito, a qual evidencia a ligação do biomarcador aos anticorpos) pela técnica de cronoamperometria, o biomarcador pode ser detectado na faixa linear de $10^{-6} \text{ ng mL}^{-1}$ a 10^2 ng mL^{-1} , com LD igual a $0,18 \text{ fg mL}^{-1}$. O imunossensor proposto foi aplicado na determinação de CEA em soro de indivíduos saudáveis e de pacientes com câncer, fornecendo resultados precisos e comparáveis aos obtidos com o método de referência (ELISA). Estudos de estabilidade revelaram, por fim, que o dispositivo apresentou estabilidade e respostas reprodutíveis durante o período de um mês sob estocagem a 4°C , o que foi atribuído à biocompatibilidade apresentada pelas AuNPs.

Em outro trabalho, Wang e colaboradores (2017) [54] empregaram um ECV modificado com um nanocompósito à base de óxido de grafeno reduzido, nanopartículas de Fe_3O_4 , AuNPs e azul de toluidina como plataforma para o desenvolvimento de um imunossensor *label-free* a ser empregado na detecção de α -fetoproteína (AFP), conhecido biomarcador de câncer de fígado. A presença das AuNPs possibilitou a imobilização dos anticorpos anti-AFP sobre a plataforma, ao passo que o óxido de grafeno reduzido juntamente com as nanopartículas de Fe_3O_4 possibilitaram a adsorção do azul de toluidina como espécie eletroativa no sistema. Após a otimização das condições para detecção, o dispositivo exibiu resposta linear por VOQ (monitorando-se a oxidação do azul de toluidina) na faixa de $1,0 \times 10^{-5} \text{ ng mL}^{-1}$ a $10,0 \text{ ng mL}^{-1}$ de AFP, com um LD igual a $2,7 \text{ fg mL}^{-1}$. O dispositivo foi eficazmente aplicado na detecção de AFP em amostras de soro, apresentando resultados em concordância com ensaios de ELISA (método padrão para detecção de AFP). Além disso, o imunossensor apresentou boa estabilidade, com variações na resposta de corrente da ordem de 5% após estocagem de um mês a 4°C , fato que foi atribuído às propriedades biocompatíveis do nanocompósito utilizado.

A utilização de SAMs de tióis sobre eletrodos ou nanopartículas de ouro é uma estratégia bem explorada para a construção de imunossensores eletroquímicos, devido a vantagens como estabilidade e possibilidade de imobilização de anticorpos e outras proteínas por meio de ligações covalentes com grupos funcionais terminais [55]. O emprego de nanopartículas metálicas juntamente à técnica de SAM pode aperfeiçoar as interações com as biomoléculas empregadas e também melhorar o desempenho eletroquímico do imunossensor, o que torna seu emprego ainda mais promissor.

No trabalho conduzido recentemente por Oliveira e colaboradores (2018) [56], um novo imunossensor voltamétrico *label-free* para detecção do antígeno prostático específico

(PSA), principal biomarcador de câncer de próstata, foi apresentado. Eletrodos de ouro modificados com SAMs de 1,6-hexanoditiol e AuNPs foram empregados como plataforma de imobilização de anticorpos anti-PSA, os quais ligaram-se diretamente às AuNPs depositadas sobre a SAM. O dispositivo mostrou-se estável e sensível, sendo capaz de determinar o biomarcador mencionado de modo reprodutível na faixa de 0,2 a 200 ng mL⁻¹ (LD = 0,01ng mL⁻¹), a partir de medidas de VOQ na presença de íons [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻.

Em outro estudo, Thangamuthu; Santschi e Martin (2018) [57] desenvolveram imunossensores amperométricos *label-free* para a detecção do biomarcador proteína reativa-C (CRP), cujos níveis plasmáticos elevados (acima de 3 mg L⁻¹) podem estar associados a desordens cardiovasculares graves, como infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e aterosclerose [57]. O dispositivo foi baseado na imobilização de anticorpos anti-CRP em uma plataforma constituída por SAM de cisteína preparadas sobre AuNPs eletrodepositadas sobre eletrodos de carbono impresso descartáveis. Por meio da realização de medidas de cronoamperometria na presença de íons [Fe(CN)₆]⁴⁻, o imunossensor foi capaz de detectar o biomarcador na faixa de 0,4 a 200,0 nmol L⁻¹, com LD = 0,15 nmol L⁻¹, apresentando também níveis satisfatórios de reprodutibilidade e de estabilidade. Tais características permitiram a aplicação do dispositivo na determinação de proteína reativa-C em amostras de soro, com porcentagens de recuperação resultantes próximos a 100%.

Diba; Kim e Lee (2017) [43], por sua vez, desenvolveram imunossensores para o peptídeo β -amiloide 1-42 (β A₁₋₄₂, um dos principais biomarcadores da doença de Alzheimer) a partir da modificação de um eletrodo de carbono impresso com AuNPs e SAM mistas de polietilenoglicol modificado com grupo tiol e de ácido mercaptopropiônico, os quais foram empregados, respectivamente, como agente de bloqueio para minimizar interações inespecíficas do biomarcador e como âncoras para imobilização de anticorpos primários anti- β A. Após imobilização de tais anticorpos sobre as SAM, imunoenaios do tipo sanduíche para β A₁₋₄₂ foram realizados empregando-se anticorpos secundários conjugados à enzima fosfatase alcalina (anti- β A-ALP). Na presença da enzima mencionada, o substrato 4-aminofenil-fosfato (adicionado ao meio de medida) é convertido a 4-aminofenol, cujo processo de oxidação foi empregado para se monitorar a presença do biomarcador estudado. Uma vez que a quantidade de enzima na superfície do eletrodo depende da concentração de β A₁₋₄₂ ligado aos anticorpos primários anti- β A, a magnitude da corrente de oxidação do produto da reação enzimática pode ser relacionada quantitativamente com a concentração de β A₁₋₄₂ presente no meio. Assim, verificou-se por VPD que o pico anódico gerado aumentou linearmente com a concentração de

βA_{1-42} no intervalo de 100 fmol L^{-1} a 25 pmol L^{-1} ($LD = 100 \text{ fmol L}^{-1}$), possibilitando a aplicação do imunossensor na determinação do biomarcador em amostras de soro humano.

A obtenção de nanopartículas metálicas (sobretudo AuNPs) via eletrodeposição também tem sido frequentemente empregada como uma estratégia para a construção de imunossensores para a detecção de biomarcadores. No trabalho de Shaikh e colaboradores (2019) [61] relata-se o desenvolvimento de imunossensores impedimétricos descartáveis para a determinação de albumina sérica humana (HSA) como um biomarcador de microalbuminúria (excreção de albumina na urina), a qual está associada a alterações renais. A plataforma descrita foi baseada na eletrodeposição de nanocristais de ouro em microeletrodos interdigitados de carbono, seguido pela imobilização de nanopartículas *core-shell* de poliestireno/Ag funcionalizadas com grupos tióis e conjugadas previamente a anticorpos anti-HSA. Verificou-se que a variação de impedância dos dispositivos após imunoensaios na presença de HSA foi linearmente dependente da concentração do biomarcador na faixa de $30,0$ a $300,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, a qual está adequada para propósitos clínicos. Visando a aplicação do imunossensor em sistemas *point-of-care*, os autores desenvolveram ainda um protótipo portátil capaz de transmitir os dados coletados com o mesmo para dispositivos móveis (como *tablets* e *smartphones*) via tecnologia *bluetooth*.

Eissa e colaboradores (2018) [59] recentemente desenvolveram um novo imunossensor voltamétrico para diagnóstico de hiperimunoglobulinemia E (condição de imunodeficiência rara caracterizada por níveis séricos elevados de IgE, e também conhecida como síndrome de hiper-IgE ou síndrome de Jó [62]), a partir da determinação simultânea dos biomarcadores proteicos STAT3, DOCK8 e PGM3 (cujos níveis séricos baixos são indicativo da doença) por VOQ na presença de íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. AuNPs foram eletrodepositadas em um *chip* constituído por um arranjo de eletrodos de carbono, seguido por modificação com SAMs de cisteamina e imobilização de anticorpos específicos aos biomarcadores previamente mencionados separadamente em cada eletrodo de trabalho presente no *chip*, por meio dos grupos amino da cisteamina e ligação cruzada com glutaraldeído. O imunossensor apresentou boa estabilidade, sensibilidade e seletividade às proteínas STAT3, DOCK8 e PGM3, com LDs iguais a 3,5; 3,1; e 2,2 pg mL^{-1} , respectivamente, e faixas lineares de $1,0 \text{ pg mL}^{-1}$ a $100,0 \text{ ng mL}^{-1}$ para DOCK8 e STAT3 e de 1 pg mL^{-1} a 10 ng mL^{-1} para PGM3. O bom desempenho analítico do imunossensor possibilitou aplicações na análise de soro sanguíneo de pacientes já diagnosticados com hiperimunoglobulinemia E, evidenciando nestes casos níveis significativamente menores dos biomarcadores em comparação a indivíduos saudáveis.

A eletrodeposição de AuNPs também foi empregada recentemente no trabalho de Chen e colaboradores (2019) [60], onde imunossensores para diagnóstico da doença infecciosa brucelose foram desenvolvidos. Eletrodos de carbono vítreo modificados com AuNPs eletrodepositadas, e posteriormente com glutatona e ácido hialurônico foram empregados como plataforma de imobilização da proteína OMP31, a qual está presente na membrana externa das bactérias do gênero *Brucella*, agentes causadores da doença mencionada. As moléculas de glutatona ligaram-se às AuNPs por meio de ligações Au-S, ao mesmo tempo que forneceram grupos amino livres para a ligação com moléculas de ácido hialurônico. Estas, por sua vez, atuaram como âncoras para a imobilização da OMP31, a partir da utilização do agente de ligação cruzada 1,4-butanodiol diglicidil éter. Os imunossensores foram então empregados na detecção de anticorpos anti-OMP31 por VPD na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, exibindo variações lineares da corrente de pico catódico com a concentração dos anticorpos na faixa de $2,08 \text{ fg mL}^{-1}$ a $1,04 \text{ pg mL}^{-1}$, e $\text{LD} = 0,50 \text{ fg mL}^{-1}$. Imunoensaios voltamétricos em amostras reais de soro evidenciaram a potencialidade clínica do dispositivo apresentado, já que os anticorpos anti-OMP31 puderam ser detectados com porcentagens de recuperação na ordem de 100% e níveis de reprodutibilidade satisfatórios.

É possível verificar, portanto, que o emprego de AuNPs na construção de imunossensores consiste em uma estratégia bastante versátil, devido às diversas configurações possíveis para modificação de superfícies eletródicas bem como à possibilidade de associação a outros materiais orgânicos e inorgânicos para a produção de modificadores compósitos. Além de diversificar as possibilidades de aplicação dos imunossensores produzidos, tais características podem aperfeiçoar o processo de imobilização dos anticorpos a serem estudados, e, deste modo, aumentar a sensibilidade dos dispositivos.

1.3 BIOSSENSORES DE DNA

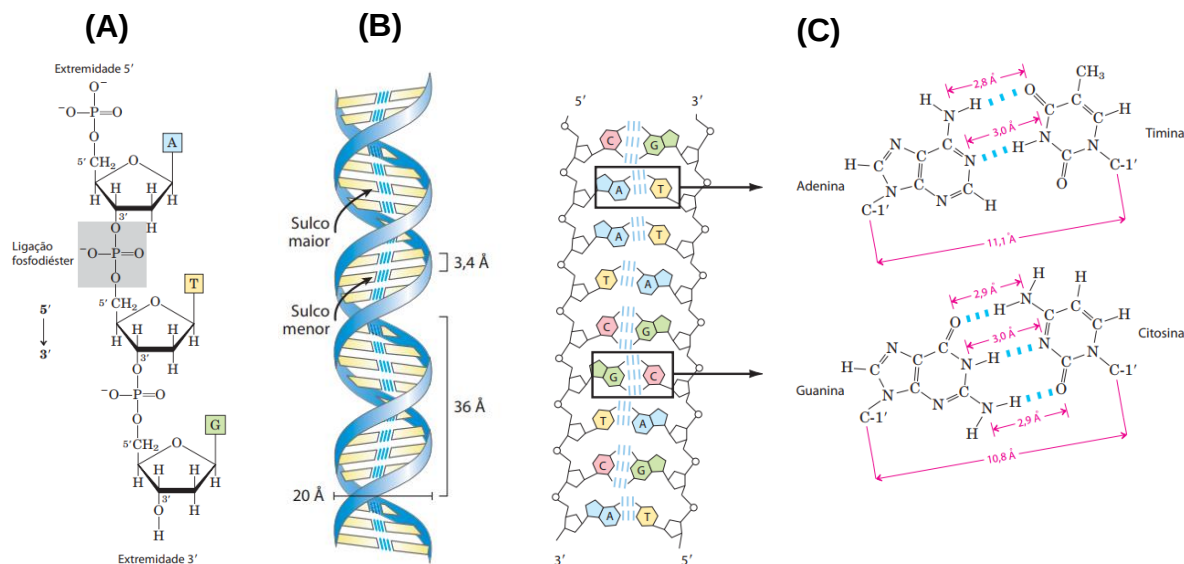
Uma vez que o DNA contém toda a informação genética de um organismo, sendo responsável pela codificação de todas as proteínas necessárias para os mecanismos bioquímicos essenciais à vida do mesmo, seu estudo está no centro de inúmeras investigações em diferentes áreas do conhecimento. Entre tais estudos, destaca-se a aplicação de fragmentos de DNA (os denominados oligonucleotídeos) como um elemento funcional versátil nanoestruturado para a construção de diversos arranjos moleculares via auto-organização, o que permite a sua aplicação em diferentes campos, incluindo bioengenharia, biossensores, bionanotecnologia, terapia gênica e fotodinâmica, sistemas *drug-delivery* e biologia molecular [63].

Os elementos estruturais básicos da estrutura do DNA são denominados desoxirribonucleotídeos, e apresentam três componentes característicos: uma base nitrogenada, uma pentose (2'-desóxi-D-ribose ou desoxirribose) e um grupo fosfato. As bases nitrogenadas que compõem a estrutura do DNA são a adenina (A) e a guanina (G) (purinas) e a citosina (C) e a timina (T) (pirimidinas). Cada uma das bases é ligada covalentemente ao carbono 1' da desoxirribose, enquanto que o fosfato é esterificado no carbono 5' da mesma [32] (Figura 1.5A).

Os nucleotídeos consecutivos do DNA são ligados covalentemente entre si por pontes compostas pelos próprios fosfatos, em que o grupo 5'-fosfato de uma unidade nucleotídica é ligado ao grupo 3'-hidroxila do nucleotídeo adjacente, por meio do estabelecimento de uma ligação fosfodiéster (Figura 1.5A). Dado seu pK_a próximo a zero, os grupos fosfatos são completamente ionizados e carregados negativamente em pH fisiológico. As cargas negativas são, de modo geral, neutralizadas por meio de interações eletrostáticas com íons metálicos e com resíduos de aminoácidos carregados positivamente em proteínas. Além disso, convencionou-se denominar como extremidade 5' da cadeia a que apresenta o grupo 5'-fosfato livre, e de extremidade 3' a que apresenta a 3'-hidroxila exposta [32].

Tridimensionalmente, o DNA é caracterizado por apresentar duas cadeias helicoidais enroladas em torno do mesmo eixo, formando uma dupla-hélice orientada à direita [32,64], segundo modelo proposto em 1953 por James Watson e Francis Crick [65] (Figura 1.5B). A dupla-hélice de DNA (também denominada dupla-fita ou duplex) é mantida estável por meio do estabelecimento de ligações de hidrogênio entre pares de bases complementares (sempre A com T e C com G, com a formação de duas e três ligações de hidrogênio, respectivamente, como mostrado na Figura 1.5C; o pareamento perfeito das bases leva à criação de um sulco maior e um sulco menor na superfície da dupla-fita) e de interações de empilhamento de bases, as quais são uma combinação de interações dos tipos dipolo-dipolo e van der Waals e caracterizam-se pelo empilhamento das bases no interior da dupla-hélice, e determinam a maior contribuição para a estabilidade do duplex [32,64].

Figura 1.5 – (A) Estrutura de uma simples-fita de DNA, com destaque para a ligação fosfodiéster entre nucleotídeos sucessivos. (B) Modelo de Watson e Crick [65] para a estrutura do DNA. (C) Esqueleto covalente de uma cadeia de DNA, mostrando as estruturas das bases nitrogenadas e as interações do tipo ligação de hidrogênio entre as mesmas.



Fonte: Referência [32].

As diversas aplicações clínicas e tecnológicas dos estudos envolvendo DNA muitas vezes envolvem sua ligação ou imobilização em substratos sólidos, principalmente quando se trata da fabricação de biossensores, sejam estes ópticos, piezoelétricos ou eletroquímicos. Especificamente, biossensores eletroquímicos à base de DNA vêm sendo amplamente estudados devido a características e vantagens como resposta rápida, versatilidade, elevada especificidade, alta sensibilidade, relativo baixo custo e possibilidade de multiplexação e miniaturização em diferentes sistemas com aplicações diversificadas [66,67], que vão desde diagnóstico clínico e investigações forenses a monitoramento ambiental e garantia de qualidade em alimentos [68]. Além das vantagens mencionadas, tais dispositivos ainda possibilitam análises do tipo *label-free*, o que minimiza o custo e diminui o número de etapas e tempo necessários à execução das medidas [69].

Os dispositivos em questão são caracterizados pela presença de sequências de DNA como elemento de reconhecimento biológico convenientemente imobilizadas em um eletrodo que atua como elemento transdutor [69]. De maneira geral, a aplicação de tais biossensores está centrada em eventos de biorreconhecimento e de interação que ocorrem entre os oligonucleotídeos imobilizados e outros compostos e biomoléculas [69], os quais possibilitam a quantificação de proteínas, peptídeos e outros biomarcadores [70–73], a detecção da hibridização com fitas complementares (visando a identificação de genes de vírus e bactérias e

de polimorfismos de nucleotídeo único) [74–78] e estudos de interação com compostos como fármacos e proteínas [79–82].

Uma prática comum ao se trabalhar com biossensores baseados em DNA consiste na utilização de espécies eletroativas como indicadores redox tanto da presença dos oligonucleotídeos na superfície do transdutor quanto da ocorrência dos eventos de interação anteriormente mencionados. Tais espécies podem atuar associando-se ao DNA imobilizado diretamente e/ou estarem presentes em solução, e geralmente apresentam respostas eletroquímicas reversíveis e em intervalos de potencial adequados ao eletrodo de trabalho [69].

A associação do marcador redox ao oligonucleotídeo imobilizado pode ocorrer por meio do estabelecimento de interações eletrostáticas, como é o caso de complexos metálicos catiônicos, que se ligam aos grupos fosfatos das sequências imobilizadas, sendo o $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ a espécie mais utilizada. Complexos aniônicos, como o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ também podem ser empregados, porém neste caso trabalha-se com a repulsão eletrostática entre tais espécies e a superfície modificada com DNA durante as medidas de caracterização [69]. Assim, ao se utilizar complexos catiônicos, a presença dos oligonucleotídeos na superfície do eletrodo, bem como do evento de hibridização, é acompanhada por um incremento nos sinais voltamétricos, ao passo que espécies aniônicas levam a uma atenuação nas respostas observadas nestas mesmas situações, ao se comparar com os resultados obtidos com a superfície eletródica não modificada.

Outros marcadores redox podem interagir com as sequências imobilizadas por meio da intercalação à dupla-fita (como daunomicina, fenoxazinas e complexos metálicos contendo ligantes aromáticos heterocíclicos) ou ainda se ligar aos sulcos presentes na estrutura tridimensional do DNA (como o corante de Hoechst 33258), conduzindo ao aparecimento ou incremento dos sinais voltamétricos previamente observados [69].

1.3.1 Estratégias para Imobilização de Oligonucleotídeos em Superfícies Condutoras

Uma das etapas cruciais durante a construção de eletrodos modificados com DNA consiste na imobilização das sequências na superfície do transdutor, cujas moléculas devem idealmente assumir uma orientação adequada que possa maximizar o reconhecimento e hibridização com a fita de DNA complementar [67]. A otimização do processo de imobilização abrange a escolha do material a partir do qual o eletrodo é confeccionado ou modificado bem como do mecanismo por meio do qual as biomoléculas serão imobilizadas. Tais escolhas devem ser realizadas levando-se em consideração a preservação da integridade estrutural e funcional

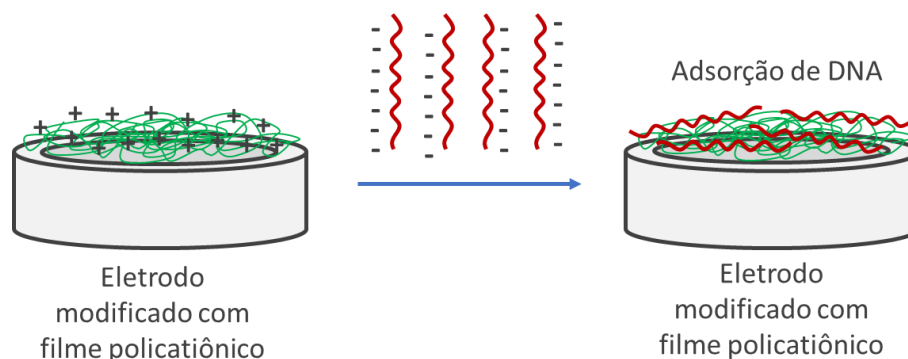
das sequências de DNA sob estudo, de modo a viabilizar a ocorrência dos eventos de biorreconhecimento na superfície do transdutor [83].

Neste sentido, entre os materiais mais frequentemente empregados na construção de biossensores contendo DNA, podem ser citados sobretudo o ouro e as diferentes formas alotrópicas de carbono (carbono vítreo, grafite, diamante e nanotubos de carbono) [68]. Por outro lado, as estratégias de imobilização mais utilizadas consistem nos métodos de imobilização por adsorção, ligação covalente e utilização do complexo estreptavidina-biotina, os quais serão abordados com mais detalhes nos parágrafos a seguir.

1.3.1.1 Imobilização por adsorção

Este método consiste no mais simples quando se trata da modificação de superfícies condutoras com DNA, uma vez que não requer reagentes específicos nem a modificação estrutural das biomoléculas com grupos funcionais que permitam sua ligação ao eletrodo [67]. Geralmente, a interação entre os oligonucleotídeos a serem imobilizados e a superfície do transdutor é de natureza eletrostática, valendo-se das cargas negativas dos grupos fosfatos presentes nas cadeias de DNA. Neste sentido, é necessário que a superfície eletródica seja modificada previamente de modo que a mesma adquira carga positiva e permita a interação com as biomoléculas sob investigação [68] (Figura 1.6). Isto pode ser alcançado, por exemplo, a partir da utilização de moléculas policationicas, como dos (bio)polímeros quitosana [84], poli-L-lisina [85], polipirrol [86] e polietilenoimina [87], seja de maneira isolada ou na forma de nanocompósitos com outros materiais. Em relação aos tipos de eletrodos empregados neste método, pode-se citar eletrodos de carbono vítreo [87], grafite [84] e de diamante dopado com boro [88].

Figura 1.6 – Representação esquemática da imobilização de simples-fitas de DNA via adsorção sobre eletrodo modificado com filmes policatiônicos.



Fonte: O autor.

Apesar de vantagens como simplicidade e baixo custo, esta estratégia acaba apresentando importantes limitações que podem comprometer o desempenho dos dispositivos desenvolvidos. Por exemplo, as moléculas de DNA inicialmente imobilizadas podem lixiviar a partir da superfície do transdutor dependendo do pH e da força iônica do meio. Além disso, os oligonucleotídeos são imobilizados de modo randômico no que diz respeito à orientação, o que pode influenciar diretamente a eficiência da hibridização [67]. Entretanto, devido à sua praticidade, diversos trabalhos ainda reportam o uso desta técnica para a modificação de eletrodos com DNA [84–87]. Por exemplo, Kuralay; Dükar e Bayramlı (2018) [85] empregaram eletrodos de grafite modificados com poli-L-lisina por meio de eletropolimerização, como plataforma para imobilização de sequências de DNA via adsorção. Os biossensores foram empregados para a detecção da hibridização com fitas complementares em amostras de soro, a partir do monitoramento da corrente de oxidação da guanina por VPD. Respostas de corrente lineares no intervalo de $1,0 \times 10^{-13}$ a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ das sequências complementares foram obtidas, com um LD igual a $2,25 \times 10^{-14} \text{ mol L}^{-1}$. Os dispositivos foram capazes distinguir sequências totalmente complementares das não-complementares e das que continham apenas um ponto de não-pareamento, maximizando seu potencial de aplicação em futuros ensaios clínicos.

1.3.1.2 Imobilização por ligação covalente

Diferentemente dos procedimentos baseados no fenômeno da adsorção, o emprego da ligação covalente como estratégia de imobilização de DNA em eletrodos demonstra elevada estabilidade e previne a dessorção dos oligonucleotídeos do substrato condutor [89]. Além

disso, esta técnica geralmente permite uma melhor orientação para as biomoléculas imobilizadas a partir da ligação de grupos funcionais presentes na extremidade das cadeias à superfície do eletrodo, o que maximiza a eficiência da hibridização com as fitas complementares [67]. Nesta estratégia, os oligonucleotídeos são sintetizados e previamente funcionalizados com grupos que possuem uma elevada afinidade pelo substrato onde se deseja realizar a imobilização [63]. A funcionalização pode acontecer na extremidade 3' ou 5', e ser realizada, por exemplo, com grupos como tiol e amino, os quais podem ligar-se covalentemente à superfície metálica do eletrodo (sobretudo Au) ou a grupos funcionais específicos introduzidos ao mesmo (como grupos carboxílicos) [67].

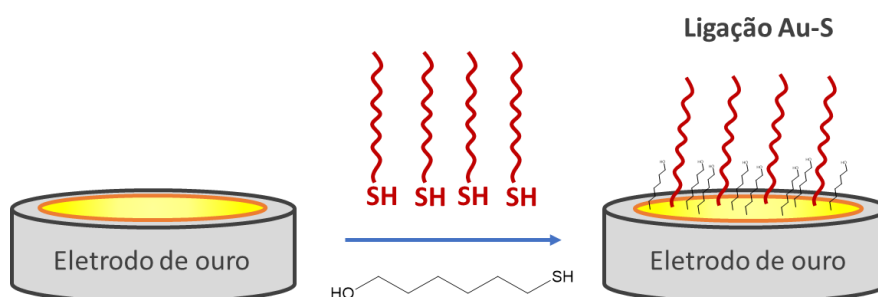
A formação de monocamadas auto-organizadas (SAM) é a estratégia mais utilizada para a imobilização de oligonucleotídeos contendo um grupo tiol na superfície de eletrodos metálicos de ouro (AuE) ou de outros materiais previamente modificados com AuNPs [90–93]. Isto deve-se à elevada estabilidade da ligação Au-S, o que reflete diretamente na estabilidade da plataforma desenvolvida. Além disso, este procedimento conta como vantagens a praticidade, a possibilidade do controle da composição das monocamadas formadas e também uma maior reprodutibilidade em relação à formação das mesmas [67]. Empregando este método, Manzano e colaboradores (2018) [93] recentemente modificaram AuEs descartáveis com SAMs de oligonucleotídeos funcionalizados com grupos -SH para a determinação de DNA do vírus da hepatite A. A modificação foi baseada na formação de ligações Au-S entre a superfície do eletrodo e as biomoléculas, e a detecção do evento de hibridização foi monitorada por medidas de VC na presença do indicador redox tripropilamina. Um LD igual a $6,9 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$ foi obtido para as amostras de DNA viral, o qual foi comparável ao valor obtido na determinação da sequência-alvo pelo método padrão de reação em cadeia da polimerase (PCR) ($6,4 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$).

A formação de SAMs de oligonucleotídeos funcionalizados com grupos tióis em AuEs pode ser acompanhada pelo estabelecimento de interações dos átomos de N das bases do DNA com a superfície metálica, levando à imobilização das sequências por meio de múltiplos sítios de ligação, além do grupo -SH [94]. A fim de se evitar a ocorrência de tais interações não específicas, a formação de SAMs de DNA em superfícies de ouro é geralmente realizada juntamente com a imobilização de um alcanotiol, usualmente 6-mercaptopexanol (MCH), dando origem a uma SAM mista entre os dois componentes (Figura 1.7). A presença de MCH não apenas minimiza o estabelecimento de tais interações não específicas, mas também suas moléculas atuam como espaçadores entre as sequências de DNA imobilizadas (controlando a densidade de oligonucleotídeos no transdutor), e favorecendo que as mesmas orientem-se “em

pé” na superfície do AuE [67,94]. A soma destes fatores acaba por aumentar a eficiência da hibridização, uma vez que facilita a interação dos oligonucleotídeos imobilizados com suas respectivas fitas complementares.

A incorporação de MCH pode ser realizada de dois modos: (a) após a formação da SAM de DNA ou (b) concomitantemente à imobilização dos oligonucleotídeos. Apesar da primeira estratégia mencionada ser a mais comum em trabalhos descritos na literatura [63], estudos realizados por Keighley e colaboradores (2008) [95] demonstraram que a mesma pode não ser completamente efetiva na remoção das interações não específicas entre o DNA imobilizado e o AuE, e que o método da co-imobilização pode conduzir à formação de monocamadas mais ordenadas. Nesta mesma perspectiva, Henry e colaboradores (2010) [96] destacam que a formação de SAM mistas de DNA/MCH em AuE de modo simultâneo confere uma maior praticidade ao método de modificação do eletrodo, uma vez que é realizada em uma única etapa.

Figura 1.7 – Representação esquemática da imobilização de simples-fitas de DNA funcionalizadas com grupos -SH sobre eletrodo de ouro na forma de SAM mistas com MCH a partir da formação de ligações covalentes Au-S.



Fonte: O autor.

Além da utilização dos AuEs convencionais, a ligação de sequências de DNA na superfície de eletrodos modificados com AuNPs tem recebido crescente atenção, uma vez que, devido à elevada área superficial apresentada por este nanomaterial, a quantidade de DNA imobilizado pode ser maximizada. Além disso, a presença das AuNPs pode ainda atuar na amplificação do sinal gerado pelo dispositivo, aperfeiçoando o processo de transdução [97]. Nesta estratégia, eletrodos confeccionados a partir de diversos materiais podem ser utilizados, como carbono [90], ITO [98], e até mesmo os próprios AuEs [99], os quais são modificados pela deposição de um filme de AuNPs (ou de seus compósitos com outros materiais) previamente à imobilização dos oligonucleotídeos por meio da formação de ligações Au-S [67]. Nesta perspectiva, Ye e colaboradores (2017) [90] modificaram um ECV com um

nanocompósito à base de hemina (tipo de porfirina contendo ferro) e óxido de grafeno reduzido, seguido pela eletrodeposição de AuNPs. Sequências de DNA funcionalizadas com grupo -SH foram covalentemente imobilizadas sobre as AuNPs contidas na plataforma. Os biossensores foram empregados na detecção da hibridização com fitas complementares às imobilizadas a partir do monitoramento da corrente de redução da hemina por VPD, e mostraram respostas lineares no intervalo de concentração $1,0 \text{ amol L}^{-1}$ a $0,1 \text{ pmol L}^{-1}$, com LD igual a $0,14 \text{ amol L}^{-1}$. O bom desempenho analítico do dispositivo foi atribuído à condutividade da plataforma e à técnica de imobilização de DNA via ligação covalente, o que conferiu estabilidade e reprodutibilidade ao biossensor.

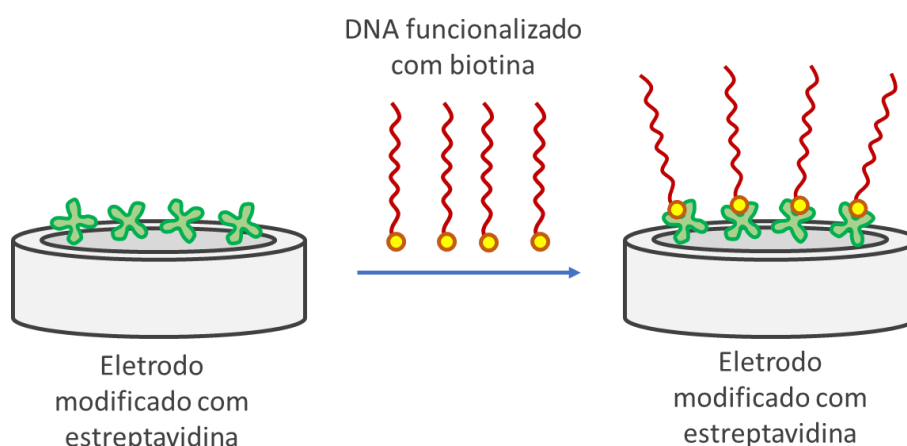
A imobilização de sequências de DNA via ligação covalente em transdutores também tem sido realizada a partir do emprego de superfícies condutoras previamente funcionalizadas com grupos como carboxila, aldeído, amino, epóxi e isotiocianato [67]. A ligação das cadeias de DNA neste caso é realizada por meio de uma reação entre os grupos funcionais presentes na superfície do transdutor e o grupo funcional contido na extremidade da cadeia dos oligonucleotídeos sob estudo [63]. A estratégia mais frequente utilizada neste método consiste no emprego de sequências de DNA funcionalizadas com grupos -NH_2 para ligação a substratos contendo grupos -COOH . Neste caso, a ligação é comumente mediada pela utilização dos reagentes EDC e NHS, por meio da ativação do grupo carboxílico e sua conversão ao intermediário mais reativo *o*-acilisoureia, que liga-se facilmente a grupos amino por meio da formação de ligações amida estáveis [67]. Utilizando-se desta estratégia, Carr e colaboradores (2020) [100] recentemente desenvolveram biossensores para a detecção de metilação no gene MGMT (processo envolvido na oncogênese de cânceres de cabeça e pescoço) por EIE na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. AuEs foram modificados com SAMs de ácido 11-mercaptoundecanoico, cujos grupos -COOH foram ativados com EDC/NHS para imobilização de oligonucleotídeos funcionalizados com o grupo -NH_2 . A estabilidade conferida pelo método de imobilização selecionado permitiu que o biossensor diferenciasse linhagens celulares tumorais contendo altas taxas de metilação no gene MGMT de linhagens com baixa metilação, sugerindo o uso promissor do dispositivo desenvolvido no diagnóstico clínico precoce das doenças mencionadas.

1.3.1.3 Utilização do complexo estreptavidina-biotina

Outra estratégia para imobilização de oligonucleotídeos em superfícies condutoras é baseada na formação do complexo entre a proteína estreptavidina e seu ligante biotina. Dada a

elevada afinidade entre ambas as moléculas e a alta especificidade da ligação, o complexo formado é altamente estável ($K_d \approx 1 \times 10^{-15}$). Além disso, a estreptavidina consiste em uma proteína tetramérica que possui quatro sítios de ligação para biotina [101,102], o que maximiza as possibilidades de interação, e pode resistir a fatores como variações no pH, temperatura e presença de agentes desnaturantes ou solventes orgânicos [103]. Neste sentido, a funcionalização de oligonucleotídeos com uma molécula de biotina na extremidade 3' ou 5', seguido por sua ligação a moléculas de estreptavidina previamente imobilizadas no transdutor (modificado quimicamente ou não) consiste em uma estratégia bastante eficaz para a modificação de eletrodos com sequências de DNA [67] (Figura 1.8).

Figura 1.8 – Representação esquemática da imobilização de simples-fitas de DNA funcionalizadas com biotina sobre eletrodo modificado com estreptavidina.



Fonte: O autor.

Empregando esta estratégia, Li e colaboradores (2016) [104] desenvolveram biossensores para a detecção de polimorfismos de nucleotídeo único no gene *vangl1*, os quais são relacionados à ocorrência de defeitos do tubo neural (grupo de severas más formações congênitas que impactam a gestação e provocam complicações de gravidade variável ao longo da vida). Eletrodos de ouro foram modificados com um filme de polipirrol e estreptavidina, seguido pela ligação de cadeias de DNA previamente hibridizadas com a sequência-alvo e funcionalizadas com biotina. A fim de se acelerar os processos de transferência eletrônica na superfície do eletrodo, AuNPs encapsuladas em poliamidoamina (PAMAM) conjugadas aos oligonucleotídeos. Monitorando-se por VPD a redução de íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, o biossensor apresentou respostas lineares com a concentração das fitas complementares no intervalo de 0,1

a $100,0 \text{ nmol L}^{-1}$ ($LD = 0,033 \text{ nmol L}^{-1}$), possibilitando a detecção do gene de interesse em amostras de soro.

A imobilização prévia da estreptavidina ou biotina na superfície eletródica tem sido realizada por meio de diferentes estratégias, entre as quais pode-se citar o estabelecimento de interações eletrostáticas entre a proteína e a superfície do eletrodo [83], formação de ligações covalentes N-Au entre grupos -NH_2 da estreptavidina e eletrodos modificados com AuNPs [66], e também a formação de ligações amida entre grupos -NH_2 da proteína e grupos -COOH presentes no transdutor (e vice-versa) a partir da utilização dos agentes de ligação 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e *N*-hidróxi-succinimida (NHS) [105,106].

A existência de métodos diversos para a modificação de superfícies eletródicas com oligonucleotídeos permite ao pesquisador adaptar os mesmos a diferentes tipos de transdutores, bem como planejar a sua preparação de acordo com a aplicação a ser dada para o dispositivo. Como resultado, as possibilidades de aplicação são diversificadas e os procedimentos de construção otimizados.

1.3.2 Métodos Analíticos para o Estudo de Interações Proteína-DNA

A existência de interações do tipo proteína-DNA em muitos processos biológicos essenciais, bem como durante a ocorrência de diversas doenças, remete à necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos que sejam simples e de baixo custo e que sejam capazes de fornecer respostas rápidas a fim de se investigar tais eventos de interação. Neste sentido, diversos métodos têm sido propostos [26] para este fim, entre os quais podem ser citados os ensaios de desvio de mobilidade eletroforética [107], calorimetria de titulação isotérmica [108], ensaios *pull-down* [109], ressonância *plasmon* de superfície (SPR) [110], ressonância magnética nuclear [111] e cristalografia de raios X [112]. Apesar de seu desempenho satisfatório, tais técnicas são geralmente lentas, de alto custo, envolvem procedimentos complexos e muitas vezes trabalhosos, além do fato de requererem marcadores fluorescentes ou radioativos [113], os quais podem ser tóxicos tanto à saúde humana quanto ao meio ambiente.

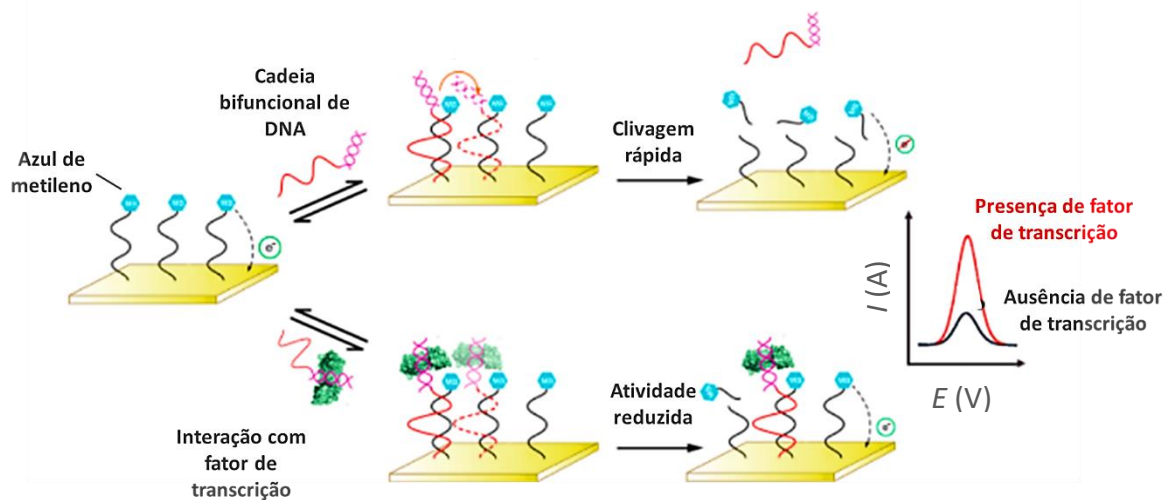
Neste contexto, técnicas eletroquímicas tais como a VPD e a EIE aliadas a dispositivos eletroquímicos baseados em DNA emergem como alternativas promissoras aos métodos previamente mencionados devido a características como análise rápida, relativo baixo custo e redução no uso de reagentes tóxicos. Consequentemente, o emprego de tais métodos para se monitorar e investigar interações do tipo proteína-DNA tem sido cada vez mais frequente e é

reportado em um crescente número de publicações [81,82,114–119]. Por exemplo, Machini; Marques e Oliveira-Brett (2019) [82] empregaram um ECV modificado com dupla-fita de DNA (via adsorção física) a fim de avaliar a interação de tais biomoléculas com o anticorpo monoclonal Nivolumab[®] (utilizado em imunoterapia para tratamento de melanoma metastático, linfoma de Hodgkin, câncer renal e câncer de pulmão). Por meio das técnicas de VPD, EIE e microbalança de cristal de quartzo, os autores verificaram que o anticorpo se liga ao DNA com elevada afinidade e promove alterações estruturais, sobretudo a partir da liberação de moléculas de adenina da cadeia, o que justifica sua atividade terapêutica. Os resultados obtidos com a plataforma foram validados a partir da realização de ensaios de interação empregando-se eletroforese em gel.

Macazo; Karpel e White (2015) [117] reportaram a modificação de um AuE com simples-fitas de DNA conjugadas ao marcador redox azul de metileno para o estudo do mecanismo de ligação da proteína g32p (isolada do vírus bacteriófago T4 e conhecida por interagir com a simples-fita do DNA) a tais sequências. A partir de variações na corrente de oxidação do azul metileno induzidas pela interação da proteína estudada com a sequência imobilizada e monitoradas por VOQ, os autores puderam comprovar que a ligação da cadeia polipeptídica completa da proteína g32p à hélice simples do DNA ocorre cooperativamente, enquanto que a interação do domínio *III (*core*) demonstrou ocorrer de maneira não-cooperativa. Além disso, os autores observaram que o evento de ligação DNA-g32p foi dependente da força iônica do meio e também do número de oligonucleotídeos que compõe a sequência.

Li e colaboradores (2017) [119] recentemente desenvolveram um ensaio para se detectar por VOQ a interação de três fatores de transcrição (NF- κ B, SP6 RNA polimerase e HNF-4 α) com sequências específicas de DNA. O sistema desenvolvido foi baseado na hibridização de cadeias bifuncionais de DNA (contendo uma desoxirribozima na extremidade 5' e uma sequência de ligação aos fatores de transcrição na extremidade 3') com oligonucleotídeos funcionalizados com azul de metileno e imobilizados em AuEs. Na ausência dos fatores de transcrição estudados, a desoxirribozima foi capaz de clivar o DNA inicialmente imobilizado, liberando a molécula de azul de metileno, o que conduziu a uma diminuição do sinal de corrente observado. Por outro lado, na presença das proteínas investigadas, a desoxirribozima apresentou uma redução em sua atividade catalítica, de modo que a molécula do marcador redox permaneceu ligada aos oligonucleotídeos, resultando em maiores valores de corrente (Figura 1.9). O sistema desenvolvido apresentou elevada especificidade e versatilidade, podendo ser facilmente adaptado para a detecção de outras proteínas.

Figura 1.9 – Princípio de funcionamento do biossensor reportado por Li e colaboradores [119] para a detecção da interação dos fatores de transcrição NF- κ B, SP6 RNA polimerase e HNF-4 α com sequências de DNA.



Fonte: Adaptado da referência [119].

No estudo desenvolvido por Dai e colaboradores (2019) [81], eletrodos impressos contendo AuNPs foram modificados com a proteína hnRNP H1 (ribonucleoproteína nuclear heterogênea H1), a qual reconhece especificamente sequências de DNA ricas em guanina. A detecção da presença de tais sequências por meio de sua ligação a proteínas específicas apresenta relevância clínica, uma vez que sequências com uma quantidade elevada de guanina podem favorecer a formação de triplex e quadruplex de DNA. Estes, por sua vez, podem afetar processos de replicação e transcrição e desta forma favorecer o desenvolvimento de doenças como câncer e distúrbios neurodegenerativos. A formação dos complexos hnRNP H1-DNA na superfície dos eletrodos foi monitorada a partir de variações de corrente medidas por VPD na presença do marcador redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. A plataforma desenvolvida foi ainda capaz de diferenciar oligonucleotídeos com diferenças estruturais pontuais (AGGGG, AGGGC, AGGGA e AAAAA), o que denotou a elevada especificidade do dispositivo desenvolvido.

A partir dos trabalhos mencionados, é possível considerar que técnicas e dispositivos eletroquímicos podem apresentar aplicações promissoras tanto na detecção de interações proteína-DNA quanto no estudo das mesmas. A versatilidade apresentada por tais sistemas, somada à rapidez de resposta, alta sensibilidade, relativo baixo custo e possibilidade de miniaturização, favorece que os mesmos sejam cada vez mais estudados e aperfeiçoados, aumentando seu potencial de utilização na investigação de eventos de interação entre as biomoléculas mencionadas.

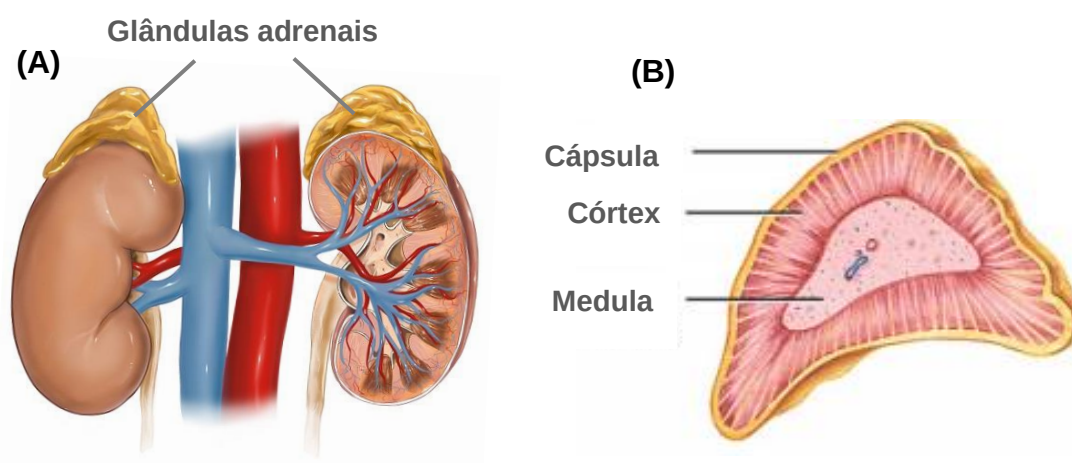
CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DE DHEAS, UM BIOMARCADOR DE CARCINOMA DE CÓRTEX ADRENAL PEDIÁTRICO

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Carcinoma de Córtex Adrenal (CCA): Características Gerais

O carcinoma de córtex adrenal (CCA) consiste em uma neoplasia rara e altamente agressiva, de natureza maligna. Como sugerido pelo próprio nome, é originado por células localizadas no córtex das glândulas adrenais ou suprarrenais (Figura 2.1) [120], região responsável por produzir e secretar uma variedade de hormônios esteroides, como cortisol, aldosterona e dehidroepiandrosterona, que desempenham várias funções biológicas essenciais, estando envolvidos em diversos mecanismos bioquímicos [121,122]. Devido à sua gravidade, o CCA apresenta mau prognóstico, uma vez que este apresenta uma taxa de sobrevida média em 5 anos de cerca de 40%, a qual é influenciada principalmente pelo grau de avanço do tumor no momento do diagnóstico [123].

Figura 2.1 – (A) Posicionamento das glândulas adrenais na parte superior dos rins e (B) subdivisões internas em suas três regiões principais: cápsula, córtex e medula.



Fonte: Adaptado das referências [124] (A) e [125] (B).

A incidência de CCA é bastante baixa, sendo observados em média de 1 a 2 novos casos por milhão a cada ano [126]. Verifica-se ainda que a incidência de CCA é levemente maior para mulheres (proporção 1,5:1) [127], e apresenta um comportamento bimodal em

relação à idade dos indivíduos afetados, uma vez que picos de ocorrência são observados na primeira e na quinta décadas de vida [128].

Em crianças abaixo de 15 anos, a ocorrência de CCA é ainda mais rara, sendo reportados apenas de 0,2 a 0,3 casos por milhão a cada ano. Curiosamente, a maior incidência anual de CCA pediátrico ocorre no sul do Brasil, onde é observado um índice de 2,9 a 4,2 novos casos por milhão, ou seja, de 10 a 15 vezes maior do que a média mundial. As razões para este fenômeno ainda permanecem incertas. Porém, relata-se que a maior prevalência de uma mutação no gene TP53 (mutação TP53 R337H) nas crianças nascidas na região seja a responsável pelo maior índice de incidência do CCA [123,129–131]. Este gene codifica a proteína denominada p53, a qual está envolvida em diversos mecanismos de reparo do DNA. A mutação TP53 R337H leva à substituição do resíduo de Arg na posição 337 por uma His na cadeia polipeptídica da p53, o que leva a disfunções da proteína mencionada e ao comprometimento de sua atividade reparadora. Como consequência, danos eventuais no material genético celular deixarão de ser corrigidos, aumentando a probabilidade de início de uma transformação maligna [132].

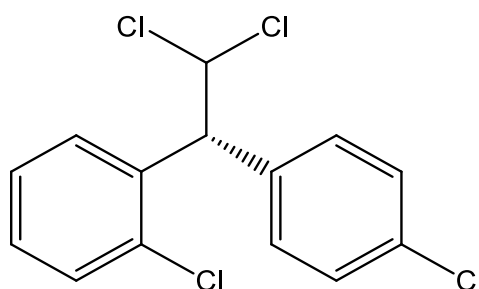
O CCA pediátrico é marcado por apresentar outra importante característica: em cerca de 90% dos casos, observa-se que os tumores são funcionais (ou seja, produzem hormônios em níveis anormais), com a superprodução de hormônios andrógenos, principalmente a dehidroepiandrosterona (DHEA) e também o seu derivado sulfatado (sulfato de dehidroepiandrosterona, DHEAS). Isto contrasta com o CCA que ocorre em adultos, onde apenas 60% do total de casos consiste em tumores funcionais que podem produzir níveis excessivos de cortisol e também de andrógenos em uma menor extensão [128]. A ausência de sinais e sintomas apresentada por uma considerável parcela dos adultos afetados pela doença (40%) pode, neste sentido, dificultar o diagnóstico precoce e consequentemente o tratamento dos mesmos [133].

2.1.2 Métodos para Tratamento e Diagnóstico de CCA

A forma de tratamento mais eficaz para pacientes diagnosticados com CCA consiste na remoção cirúrgica do tumor [134]. Geralmente, a ressecção completa do tumor pode conferir aos indivíduos uma maior chance de cura e maior tempo de vida, e, devido a isso, esta é a opção de tratamento preferida na maior parte dos casos [128]. Apesar da recorrência da doença ser observada em cerca de 30-50% dos pacientes [120], a utilização de terapias coadjuvantes é comumente empregada para que este risco seja consideravelmente diminuído [129].

A radioterapia tem sido considerada como uma forma de tratamento não-efetiva para CCA, embora alguns estudos demonstrem que este tipo de tumor pode ser sensível à radiação, e que então esta pode ser uma alternativa a se considerar nos casos em que a doença está ainda localizada e nos seus estágios iniciais [120,135]. Por outro lado, o emprego de agentes quimioterápicos é bem mais difundido, inclusive para tratamento de casos avançados de CCA. O principal agente empregado é o derivado de inseticida mitotano (1-(*o*-clorofenil)-1-(*p*-clorofenil)-2,2-dicloroetano, Figura 2.2), seja de maneira isolada, ou em combinação com outras drogas citotóxicas [126]. O mitotano age nas células do tecido adrenal com uma relativa especificidade (apesar de alguns efeitos colaterais relacionados ao trato gastrointestinal e aos sistemas nervoso e endócrino serem comuns), e acredita-se que seu mecanismo de ação consista na inibição, por parte de seus metabólitos, da cadeia respiratória mitocondrial das células neoplásicas, assim como de enzimas que estão envolvidas nas vias de síntese dos hormônios esteroidais. Estes dois efeitos combinados explicam o seu potencial citotóxico, e podem, portanto, levar à morte celular e à regressão do tumor [120,129].

Figura 2.2 – Estrutura química do mitotano, o principal agente quimioterápico utilizado para o tratamento de CCA.



Fonte: O autor.

Considerando a ausência de sintomas específicos, aproximadamente 70% dos pacientes são diagnosticados com CCA em estágios avançados da doença, para os quais as chances de cura infelizmente são pequenas [136]. Por exemplo, a taxa de sobrevivência para pacientes com CCA em estágio de metástase no momento do diagnóstico costuma ser inferior a um ano [137]. Neste sentido, devido ao seu potencial maligno e metastático, o diagnóstico precoce de CCA é extremamente importante e necessário a fim de se conferir aos pacientes maiores chances de cura e eficácia no tratamento.

Os principais métodos empregados para diagnóstico do CCA em pacientes consistem em técnicas baseadas em imagem, como ressonância magnética e tomografia computadorizada. Tais métodos são aplicados tanto para se confirmar casos suspeitos da doença quanto para se

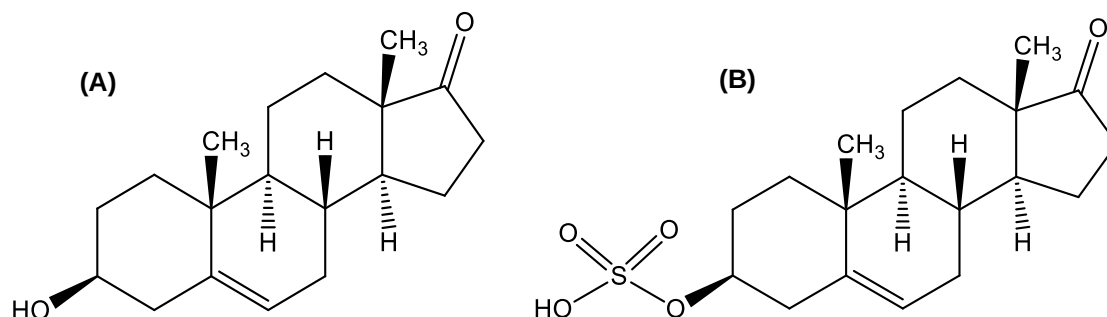
avaliar se as lesões eventualmente observadas são malignas ou benignas, uma vez que tanto o tamanho quanto o aspecto do tumor podem ser facilmente verificados [128].

Além disso, trabalhos tem destacado a importância da detecção da presença da mutação TP53 R337H em recém-nascidos como uma das estratégias mais eficazes de acompanhamento e diagnóstico precoce de CCA pediátrico [138,139]. Tais estratégias permitem não somente a detecção da mutação, mas também fornece meios de se investigar os fatores que podem levar ao desenvolvimento do tumor. Por exemplo, Costa e colaboradores (2019) [139] reportam que carreadores da mutação mencionada que vivem em regiões rurais apresentam um risco menor de desenvolver a doença comparado àqueles que vivem em grandes centros urbanos marcados por atividade industrial. Os autores destacam ainda que a incidência de CCA pediátrico é diretamente proporcional à frequência da mutação R337H, mas que fatores ambientais (como presença ou ausência de poluentes) podem modificar tais observações [139].

O monitoramento hormonal dos indivíduos com suspeita de CCA consiste também em uma estratégia eficaz para ser aplicada em diagnóstico, pois, como mencionado anteriormente, tais tumores são usualmente funcionais. A determinação da concentração plasmática dos hormônios relacionados ao CCA pode ser empregada também como uma forma de acompanhamento pós-cirúrgico de pacientes operados, uma vez que pode fornecer evidências consistentes de uma possível recorrência da doença [128,129]. Devido a estas razões, hormônios adrenais são frequentemente tomados como biomarcadores de CCA.

Particularmente, os esteroides DHEA e DHEAS (Figura 2.3) estão entre os hormônios cujas alterações em suas concentrações plasmáticas podem ser diretamente associadas à ocorrência de tumores adrenais. Ambos são secretados pelas glândulas suprarrenais e são os esteroides presentes em maior quantidade no organismo humano [140,141], atuando como os mais importantes precursores diretos ou indiretos de esteroides sexuais, como testosterona e estradiol [142]. A maior parte do DHEA é lançada na corrente sanguínea na forma do derivado sulfatado DHEAS, o qual é mais facilmente transportado. Consequentemente, a concentração de DHEAS circulante é geralmente muito superior à concentração de DHEA livre [143].

Figura 2.3 – Estrutura química da (A) dehidroepiandrosterona (DHEA) e do (B) sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), hormônios esteroides considerados biomarcadores de CCA.



Fonte: O autor.

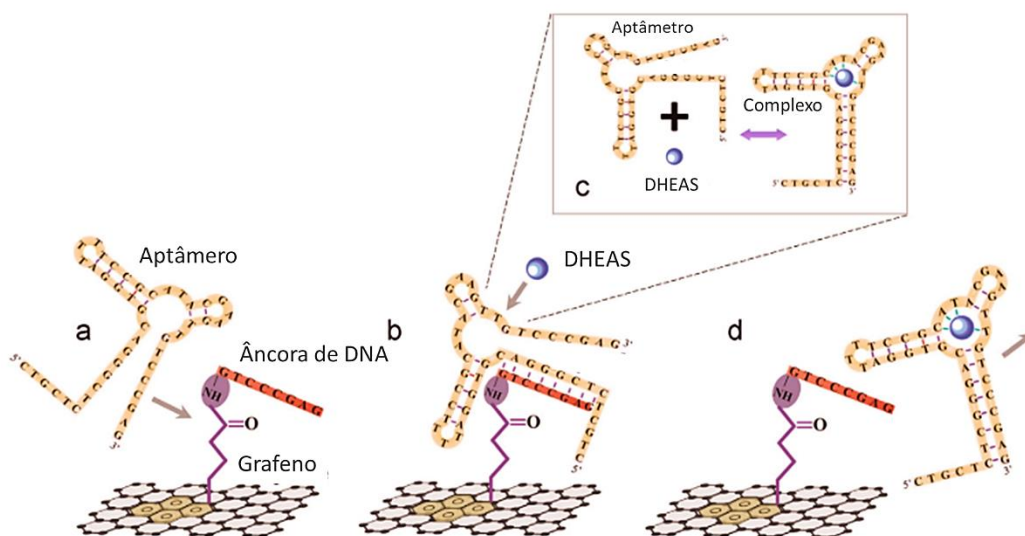
É bem conhecido que pacientes diagnosticados com CCA pediátrico costumam apresentar níveis plasmáticos de DHEAS superiores aos apresentados por indivíduos saudáveis (geralmente acima de $15 \mu\text{g dL}^{-1}$ para crianças na faixa de 1 a 5 anos de idade, e acima de $50 \mu\text{g dL}^{-1}$ para indivíduos na faixa de 5 a 11 anos) [144–147]. Interessantemente, a situação oposta, quando baixas concentrações do mesmo estão presentes na corrente sanguínea, pode sugerir o desenvolvimento de um adenoma benigno [135,148]. Assim, a determinação do padrão de secreção de DHEAS pode ser útil como um biomarcador do potencial maligno de uma lesão previamente observada [129,149].

Devido à associação direta entre altos níveis de DHEAS (ou DHEA) e a ocorrência de CCA e outros distúrbios adrenais, alguns métodos analíticos têm sido propostos e utilizados para o monitoramento do referido hormônio em fluidos biológicos como soro, saliva e urina. Entre as técnicas empregadas recentemente é conveniente citar a cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia gasosa, ambas acopladas à espectrometria de massas (HPLC-MS/MS, LC-MS/MS e CG-MS/MS) [150–155] e o ELISA [156–159].

No que diz respeito a métodos eletroquímicos, apenas três trabalhos foram reportados até o presente momento. Wang e colaboradores (2015) [160] desenvolveram um dispositivo do tipo transistor de efeito de campo baseado em grafeno funcionalizado com fragmentos de DNA (âncoras) complementares a um aptâmero específico para a detecção de DHEAS. O princípio de funcionamento do dispositivo baseou-se na hibridização inicial do aptâmero às âncoras de DNA imobilizadas nas folhas de grafeno, seguido pela ligação específica do mesmo à molécula de DHEAS. Esta ligação ocasiona uma alteração na conformação do aptâmero, com a concomitante quebra do híbrido previamente formado e liberação da biomolécula em questão da superfície do grafeno (Figura 2.4). Considerando-se que o aptâmero apresenta uma

densidade de cargas negativas relativamente alta, sua liberação induz uma alteração na condutância do grafeno que pode ser empregada para se detectar a presença de DHEAS. Além disso, os autores verificaram que o tempo de liberação do aptâmetro foi proporcional à concentração de DHEAS no intervalo de 2,5 a 1000,0 nmol L⁻¹, com LD = 44,7 nmol L⁻¹, o que está adequado para propósitos clínicos.

Figura 2.4 – Princípio de funcionamento do biossensor reportado por Wang e colaboradores (2015) [160] para a determinação de DHEAS.



Fonte: Adaptado da referência [160].

Sob outra perspectiva, Balaban e colaboradores (2019) [161] reportaram recentemente um imunossensor *label-free* para a determinação de DHEAS em amostras sintéticas de urina e soro. Anticorpos específicos à DHEA foram imobilizados via ligação cruzada com glutaraldeído sobre eletrodos de ouro modificados com uma SAM de cisteamina, seguido pela detecção de DHEAS por VPD na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como marcador redox. O imunossensor mostrou boa sensibilidade e reprodutibilidade, sendo capaz de quantificar o analito na faixa de 2,5 a 100,0 ng mL⁻¹ (LD = 3,971 ng mL⁻¹), sem sofrer influência significativa de interferentes como testosterona, colesterol, ácido úrico, ácido láctico e ácido ascórbico. Além disso, as concentrações de DHEAS determinadas como imunossensor por VPD foram semelhantes às determinadas por meio da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com analisador híbrido quadrupolo-tempo de voo (LC-QToF/MS) nas amostras estudadas.

O trabalho apresentado no presente capítulo foi o primeiro a relatar o desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico *label-free* para a detecção de DHEAS, como um método

alternativo a ser aplicado em diagnóstico clínico precoce de CCA pediátrico [162]. Os resultados obtidos relatam a síntese e caracterização de AuNPs-ARG, seguido por aplicação das mesmas na modificação de eletrodos de carbono vítreo oxidados (ox-ECV), a fim de se construir uma plataforma para imobilização de anticorpos monoclonais IgM anti-DHEA. O desempenho dos dispositivos em relação à detecção de DHEAS foi avaliado por meio da determinação do mesmo em amostras de soro de pacientes com CCA pediátrico.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um imunossensor eletroquímico à base de AuNPs para detecção do biomarcador DHEAS, visando potenciais aplicações em diagnóstico clínico precoce de CCA pediátrico.

2.2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas de ouro a partir da redução química do íon complexo $[\text{AuCl}_4]^-$, utilizando-se o aminoácido L-arginina como agente estabilizante e o monossacarídeo D-glucose como agente redutor (AuNPs-ARG);
- Caracterizar as nanopartículas obtidas por meio de técnicas espectroscópicas (espectroscopia de absorção da região do UV-VIS e do infravermelho (FTIR)), de espalhamento (espalhamento dinâmico da luz (DLS)), determinação do potencial zeta, morfológicas (microscopia eletrônica de transmissão (MET)) e difratometria de raios X (DRX);
- Modificar eletrodos de carbono vítreo (ECV) com as AuNPs-ARG e empregar os mesmos como plataforma de imobilização de anticorpos monoclonais IgM anti-DHEA para detecção do biomarcador DHEAS, com objetivo de se desenvolver um sensor para o diagnóstico precoce de CCA pediátrico;
- Otimizar a construção dos imunossensores de modo multivariado por meio de planejamentos fatoriais e metodologia de superfície de resposta realizando estudos de voltametria cíclica (VC) e de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para se otimizar o processo de imobilização e construção dos imunossensores;

- Realizar estudos de seletividade com os imunossensores desenvolvidos frente a compostos esteroides como testosterona, progesterona e colesterol;
- Aplicar os imunossensores em imunoensaios *in vitro* para a detecção de DHEAS em amostras de plasma sanguíneo de pacientes.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico e utilizados sem purificação prévia. O aminoácido L-arginina (ARG), o ácido tetracloroáurico trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), a D-glucose, os sais hexacianoferrato(II) de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) e hexacianoferrato(III) de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), a albumina de soro bovino (BSA), os agentes de ligação cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e *N*-hidroxisuccinimida (NHS), e os esteroides colesterol, testosterona e progesterona foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. O hormônio DHEAS foi adquirido da Steraloids®, e o soro fetal bovino (FBS; Gibco) foi adquirido da Thermo Fisher Scientific®. As amostras dos anticorpos monoclonais anti-DHEA (classe IgM) foram obtidas por Fogaça e colaboradores [163], e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Imunoquímica da Universidade Federal do Paraná (UFPR, Curitiba, Paraná, Brasil).

Todos os materiais e soluções empregados na construção dos imunossensores para DHEAS foram previamente esterilizados em autoclave. O tampão fosfato-salino (PBS) $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparado em pH 7,4 empregando-se os sais Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 e NaCl , e foi utilizado para o preparo das soluções de IgM anti-DHEA (à qual foram acrescentados os agentes de ligação EDC e NHS, nas concentrações finais de $50,0$ e $25,0 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente), BSA, DHEAS e dos demais esteroides estudados.

2.3.2 Síntese e Caracterização das AuNPs-ARG

As AuNPs-ARG foram obtidas a partir da redução química do íon complexo $[\text{AuCl}_4]^-$ por D-glucose na presença de L-arginina, segundo método adaptado do trabalho de Kumar; Sheo e Upadhyay (2016) [164]. Alíquotas de soluções estoque de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($2,25 \text{ mmol L}^{-1}$), de ARG (100 mmol L^{-1}) e de D-glucose ($0,50 \text{ mol L}^{-1}$) foram misturadas sob agitação magnética e aquecimento a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho térmico. Após homogeneização, gotas de uma

solução de NaOH 2,0 mol L⁻¹ foram adicionadas a fim de se elevar o pH do meio até 11,0. Deixou-se a reação se processar durante 10 minutos. Após este intervalo de tempo, as AuNPs-ARG recém-formadas (diâmetro médio de 5,5 nm; morfologia esférica) foram rapidamente transferidas para tubos de armazenamento e então resfriadas em banho de gelo. Quando não utilizadas, as suspensões resultantes foram mantidas ao abrigo da luz e sob refrigeração a 4 °C (estabilidade superior ao período de um ano).

A suspensão de AuNPs-ARG foi caracterizada por espectroscopia na região do UV-VIS (espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50, diluição na proporção 1:2), FTIR (equipamento Shimadzu, modelo FTIR-8400), espalhamento dinâmico da luz (DLS) e determinação do potencial zeta (equipamento Malvern, modelo NanoZ590, amostra diluída na proporção 1:2), MET (microscópio JEOL JEM 1200EX-II, operando a 200 kV) e DRX (difratômetro Shimadzu XRD-6000). Para a obtenção dos espectros de FTIR, empregou-se filme *cast* da suspensão de AuNPs-ARG depositado sobre substrato de silício previamente limpo em solução composta por H₂O₂, NH₄OH e H₂O (proporção 1:1:5, respectivamente), em ebulição. Para fins de comparação, espectros de FTIR para filme *cast* de uma solução de ARG 100 mmol L⁻¹ foram também obtidos. As amostras para análise de MET foram preparadas pelo gotejamento de 20 µL das AuNPs-ARG (diluição na proporção 1:2) em *grids* de cobre recobertos com carbono, seguido por secagem à temperatura ambiente. Os difratogramas de raios X foram obtidos em amostras das AuNPs-ARG liofilizadas, com equipamento operando a 40 kV com corrente de 30 mA e com fonte de radiação Cu K α de comprimento de onda igual a 1,54 Å. Os dados foram coletados para valores de 2 θ na faixa de 30° a 80°, com uma velocidade de varredura igual a 0,12° min⁻¹.

2.3.3 Preparação dos Imunossensores Eletroquímicos para DHEAS

Os imunossensores para DHEAS foram construídos sobre eletrodos de carbono vítreo comerciais (ECV) de área aproximadamente igual a 3,1 mm². Inicialmente, a superfície do ECV foi limpa por meio de polimento em suspensão aquosa de alumina (granulometria 0,3 µm) sobre um pano de polimento apropriado e umedecido com água destilada. Posteriormente, o ECV foi lavado com água destilada, imerso em álcool etílico absoluto (98%) e então colocado em banho ultrassônico durante 10 minutos, com posterior secagem ao ar.

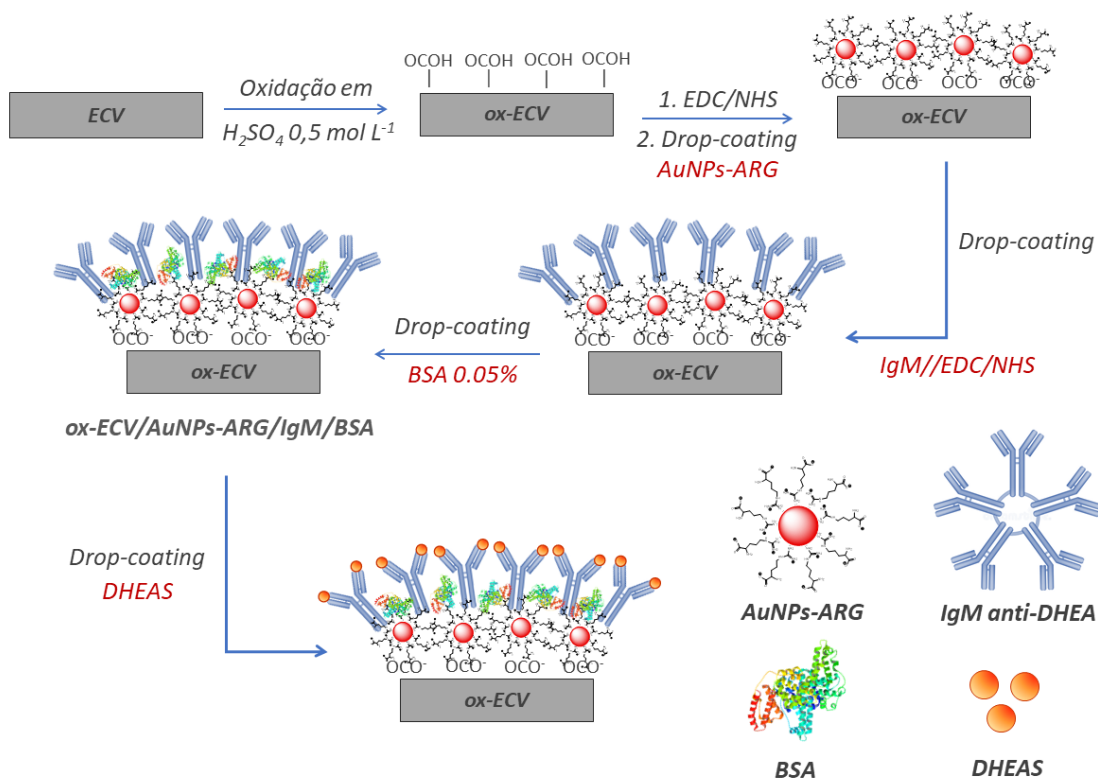
O processo para a construção dos imunossensores consistiu em 5 etapas principais, as quais encontram-se esquematizadas na Figura 2.5 e são descritas a seguir:

- *Etapa I: oxidação voltamétrica do ECV* – Após limpeza, a superfície do eletrodo foi oxidada em meio de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, por meio da aplicação de 30 ciclos de VC a 100 mV s^{-1} na faixa de $-0,3$ a $1,5 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl), a fim de que grupos carboxílicos fossem criados e estivessem disponíveis para ligação com as AuNPs-ARG. Após este processo, os eletrodos oxidados (ox-ECV) foram lavados com água destilada e secos ao ar;
- *Etapa II: ativação química dos grupos carboxílicos do ox-ECV* – A seguir, alíquotas de $20 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de EDC 100 mmol L^{-1} e NHS 50 mmol L^{-1} foram depositadas sobre o ox-ECV, seguido por um tempo de incubação de 30 minutos. Neste processo, intermediários reativos são formados, os quais posteriormente podem se ligar covalentemente aos grupos amino presentes nas AuNPs-ARG. Após a incubação, a superfície do ECV foi lavada com água destilada;
- *Etapa III: deposição das AuNPs-ARG* – Após ativação química dos grupos carboxílicos gerados na superfície eletródica, o ox-ECV foi incubado por 60 minutos em $20 \text{ }\mu\text{L}$ da suspensão de AuNPs-ARG, a fim de que as nanoestruturas fossem ligadas covalentemente aos grupos funcionais mencionados anteriormente. A seguir, o excesso de material depositado foi removido por lavagens em água destilada, obtendo-se o ox-ECV/AuNPs-ARG;
- *Etapa IV: ligação dos anticorpos IgM anti-DHEA* – Em seguida, $20 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de anticorpos IgM anti-DHEA (contendo $50,0$ de EDC e $25,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de NHS; concentração de IgM variada na faixa de $0,15$ a $10,0 \text{ }\mu\text{g dL}^{-1}$) foram depositados sobre a superfície do ox-ECV modificada pelas AuNPs-ARG (ox-ECV/AuNPs-ARG) por *drop-coating*, deixando-se o conjunto em incubação por um tempo que variou de 30 a 132 minutos. Após isso, as moléculas proteicas não ligadas foram removidas por meio de imersões sucessivas em tampão PBS;
- *Etapa V: bloqueio dos sítios de ligação não-específicos* – Por fim, o eletrodo foi incubado por 30 minutos em $20 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de BSA $0,05\% \text{ m/V}$ para bloqueio dos sítios da superfície não ocupados pelas moléculas de IgM anti-DHEA. Deu-se então uma nova lavagem da superfície do ECV em tampão PBS, finalizando-se deste modo a preparação do imunossensor para DHEAS (designado como ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM).

Os imunoenaios para detecção de DHEAS foram realizados por meio da deposição de $20 \text{ }\mu\text{L}$ da solução do biomarcador ou de plasma na superfície dos imunossensores, seguido por incubação durante 30 minutos sob aquecimento a temperatura que variou de 27°C a 37°C .

Após este tempo, os imunossensores foram lavados em tampão PBS e então submetidos a análises de VC e EIE (condições descritas no item 2.3.6).

Figura 2.5 – Representação esquemática do processo de construção dos imunossensores para DHEAS, com a posterior formação dos imunocomplexos entre as moléculas de IgM e as moléculas do biomarcador.



Fonte: O autor.

2.3.4 Otimização da Preparação dos Imunossensores e dos Imunoensaios para DHEAS

A fim de se obter uma maior eficiência nos imunoensaios na presença do biomarcador DHEAS, as variáveis: concentração da solução dos anticorpos ($[IgM]$), tempo de incubação dos eletrodos na solução dos anticorpos (tempo_{inc}) e temperatura de realização dos imunoensaios (T) foram otimizadas para a preparação dos imunossensores por meio de planejamentos fatoriais completos e análise por metodologia de superfície de resposta. Avaliou-se como resposta a variação percentual na resistência à transferência de carga (ΔR_{ct}) obtida por EIE após a realização de imunoensaios na presença de uma concentração fixa de DHEAS igual a $150 \mu\text{g dL}^{-1}$. Os valores de ΔR_{ct} foram calculados a partir da seguinte equação:

$$\Delta R_{ct} = \left(\frac{R_{ct(imr)} - R_{ct(ims)}}{R_{ct(ims)}} \right) \cdot 100\%$$

onde $R_{ct(imr)}$ é o valor de R_{ct} obtido após o imunoensaio e $R_{ct(ims)}$ corresponde ao valor de R_{ct} apresentado pelo imunossensor antes da imunorreação. Para tratamento dos dados, empregou-se o *software* Statistica® 10.0.

Inicialmente, um planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata no ponto central foi realizado a fim de se realizar uma triagem (*screening*) entre as três variáveis mencionadas e estudar a influência de cada uma sobre a resposta de interesse. Os valores dos níveis estudados para cada uma das variáveis são apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Valores dos níveis das variáveis empregados na triagem via planejamento fatorial 2^3 para otimização da construção dos imunossensores para DHEAS.

Variável	(-)	(0)	(+)
[IgM] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,0	5,5	10,0
tempo _{inc} (minutos)	30	60	90
T ($^{\circ}\text{C}$)	27	32	37

Após a triagem, a otimização foi continuada por meio da realização de um planejamento 2^2 composto central (triplicata no ponto central) e análise por MSR, tendo-se por objetivo obter a melhor condição experimental para a preparação do imunossensor, o que reflete diretamente na sensibilidade do mesmo. As variáveis estudadas nesta etapa foram a [IgM] e o tempo de incubação, sendo que todos os imunoensaios foram realizados à temperatura fixa de 37°C . O modelo matemático gerado foi então submetido à análise de variância (ANOVA; 95% de confiança) para avaliação do seu ajuste aos dados experimentais obtidos. Os níveis das variáveis estudadas no planejamento em questão são apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Valores dos níveis das variáveis empregados no planejamento fatorial 2^2 composto central para otimização da construção dos imunossensores para DHEAS.

Variável	(-1,41)	(-)	(0)	(+)	(+1,41)
[IgM] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,15	0,4	1,0	1,6	1,85
tempo _{inc} (minutos)	48	60	90	120	132

2.3.5 Curvas Analíticas e Determinação de DHEAS em Amostras Clínicas

Curvas analíticas para a determinação de DHEAS foram obtidas na faixa de 10 a 110 $\mu\text{g dL}^{-1}$ ($n = 3$) empregando-se a técnica de EIE, com o imunossensor construído nas condições otimizadas. Parâmetros analíticos como limite de detecção (LD), sensibilidade, precisão (reprodutibilidade) e exatidão foram determinados de acordo com as normas definidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e segundo a Conferência Internacional para Harmonização [165,166].

A fim de se verificar o desempenho analítico do ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM para a determinação de DHEAS em amostras clínicas reais, imunoensaios foram realizados em três amostras de plasma humano. Tais amostras foram coletadas de pacientes do Hospital Pequeno Príncipe (Curitiba, Paraná, Brasil), e os correspondentes níveis de DHEAS foram determinados por quimioluminescência (método padrão) pelo Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (Curitiba, Paraná, Brasil). Para a realização das análises eletroquímicas com o imunossensor, as amostras de plasma foram diluídas (proporções 1:2; 1:4 ou 1:9) em tampão PBS pH 7,4. Após incubação durante 30 minutos a 37 °C nas amostras diluídas, a superfície eletródica foi lavada com tampão PBS contendo 0,1% do surfactante Triton X para uma remoção de ligações inespecíficas. O nível de DHEAS nas amostras foi determinado em triplicata ($n = 3$) com referência às curvas analíticas obtidas previamente.

2.3.6 Medidas Eletroquímicas

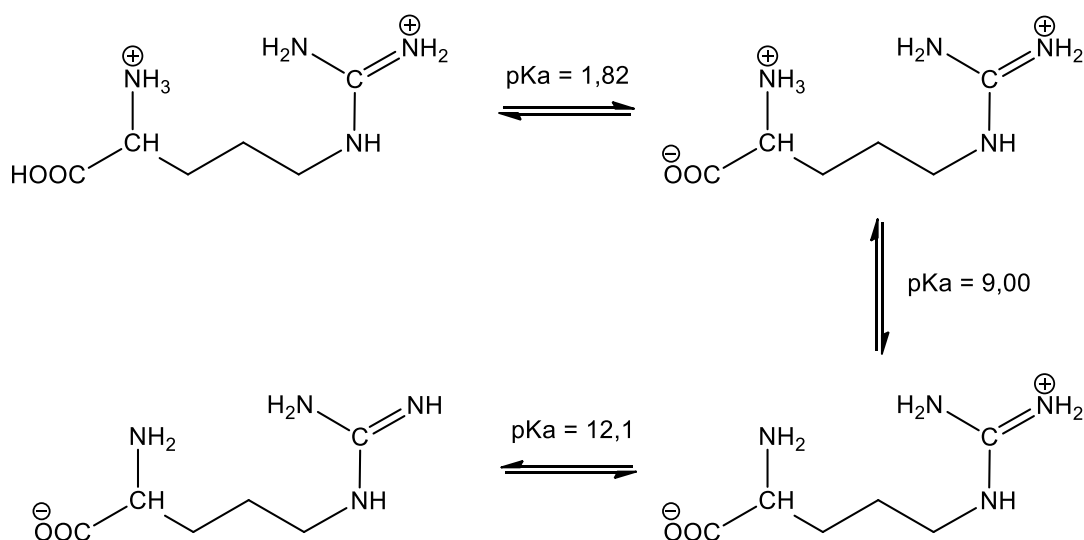
Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula convencional contendo três eletrodos, sendo empregado o ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM como eletrodo de trabalho, um eletrodo Ag/AgCl como eletrodo de referência e um fio espiral de platina como eletrodo auxiliar. Os experimentos foram conduzidos em um potenciostato/galvanostato Multi Autolab (modelo M204) controlado pelo *software* Nova 2.1[®], utilizando-se como eletrólito suporte uma solução equimolar de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5,0 mmol L^{-1} (sonda eletroquímica), preparada em tampão PBS 0,15 mol L^{-1} pH 7,4. As medidas de VC foram realizadas na faixa de -0,3 a +0,8 V, com uma velocidade de varredura de potencial igual a 50 mV s^{-1} . Para as medidas de EIE, um potencial de +0,24 V com perturbação senoidal de amplitude 10 mV (frequência variando de 10 kHz a 100 mHz) foi aplicado sobre o eletrodo de trabalho. Os valores de R_{ct} foram obtidos a partir de ajuste dos resultados (diagramas de Nyquist) ao circuito de Randles e também utilizando o *software* Nova 2.1[®].

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Síntese e Caracterização das AuNPs-ARG

Com o objetivo de se aplicar as AuNPs sintetizadas na construção de uma plataforma para a imobilização de anticorpos IgM anti-DHEA, selecionou-se a L-arginina (ARG) como agente estabilizante e funcionalizante das mesmas. A razão para esta escolha foi baseada no fato de que os grupos amino presentes na estrutura química do aminoácido (Figura 2.6) apresentam a propriedade de se ligar covalentemente a grupos carboxílicos via ligação amida [167,168], o que possibilitaria a ligação das AuNPs-ARG à superfície oxidada dos ECV e também aos grupos carboxilatos terminais da porção Fc das moléculas dos anticorpos.

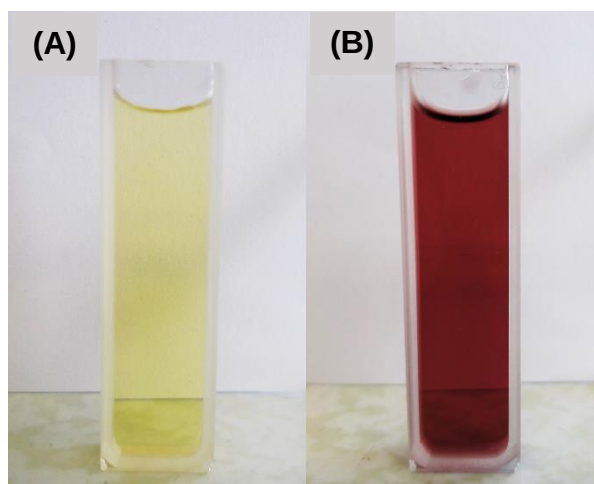
Figura 2.6 – Etapas de desprotonação do aminoácido L-arginina.



Fonte: O autor (os valores de pKa estão de acordo com os mencionados na referência [64]).

Visualmente, a formação das AuNPs a partir da redução do precursor $[\text{AuCl}_4]^-$ com D-glucose e estabilização com a ARG foi indicada pela mudança na coloração da solução, de amarelo (coloração característica do íon complexo $[\text{AuCl}_4]^-$) para vermelho-escuro (cor característica das AuNPs em suspensão), como mostrado na Figura 2.7.

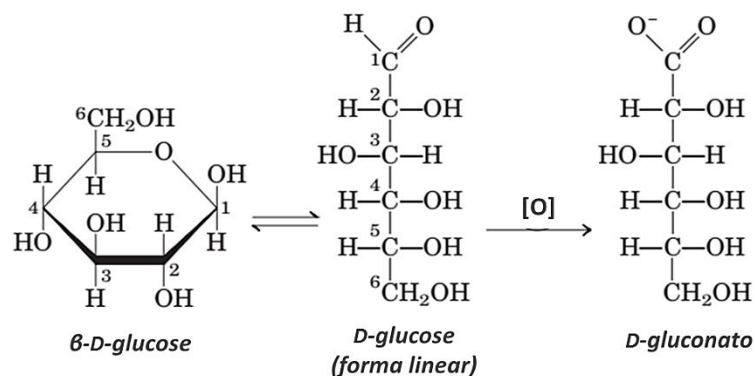
Figura 2.7 – (A) Solução aquosa a 9 mmol L^{-1} do complexo $[\text{AuCl}_4]^-$, empregado como precursor metálico para síntese das AuNPs-ARG. (B) Suspensão de AuNPs-ARG, obtida empregando-se $[[\text{AuCl}_4]^-] = 2,25 \text{ mmol L}^{-1}$; $[\text{ARG}] = 100,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{D-glucose}] = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$.



Fonte: O autor.

É bem conhecido da literatura que a D-glucose pode atuar como um agente redutor moderado devido à presença de um grupo aldeído em sua estrutura, o qual é passível de sofrer oxidação a carboxilato em meio básico e na presença de certos íons metálicos, gerando assim o derivado conhecido como D-gluconato. Tal grupo é apenas exposto quando a molécula do monossacarídeo encontra-se na forma linear, que existe nas soluções em equilíbrio com a forma cíclica (Figura 2.8) [32]. Neste sentido, na presença dos íons $[\text{AuCl}_4]^-$, o grupo aldeído da D-glucose é oxidado a carboxilato, com a concomitante redução do complexo precursor a AuNPs. O meio alcalino e o processo de aquecimento constituem condições essenciais para que o processo descrito possa acontecer [169], uma vez que favorecem que o equilíbrio do monossacarídeo seja parcialmente deslocado em direção à forma linear, expondo o grupo aldeído e possibilitando o início da reação. De fato, nos experimentos desenvolvidos, somente após a adição das gotas de NaOH à mistura reacional sob aquecimento a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ é que se observou o início do processo de formação das AuNPs.

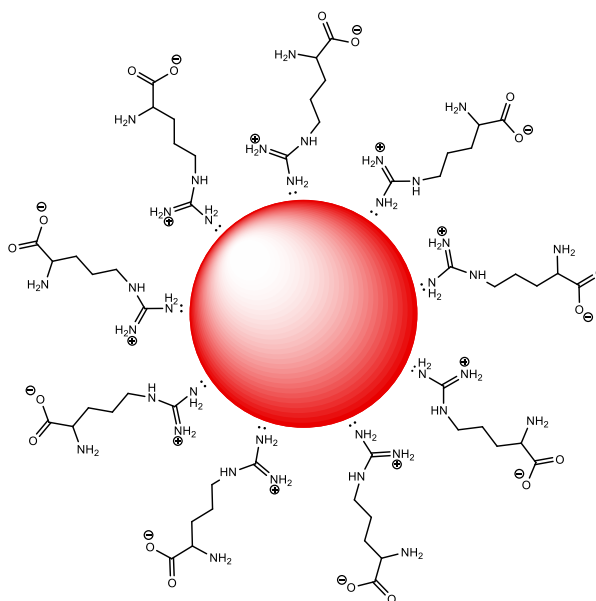
Figura 2.8 – Equação química simplificada do processo de oxidação do monossacarídeo D-glucose.



Fonte: Adaptado da referência [170].

Uma vez formadas, pode-se assumir que as AuNPs são envolvidas e estabilizadas pelas moléculas de ARG, possivelmente formando um arranjo estrutural como os descritos no trabalho de Zare; Akbarzadeh e Bararpour (2012) [171] e Ramezani; Amanlou e Rafii-Tabar (2014) [172], e idealmente representado na Figura 2.9. Segundo estes modelos, os grupos NH_2 desprotonados das moléculas de ARG ligam-se às AuNPs formadas possivelmente por meio de interações de caráter covalente do tipo Au-N, como consequência da afinidade existente entre os grupos amino e os átomos de Au da superfície das AuNPs [171,172].

Figura 2.9 – Representação esquemática ideal das AuNPs-ARG.



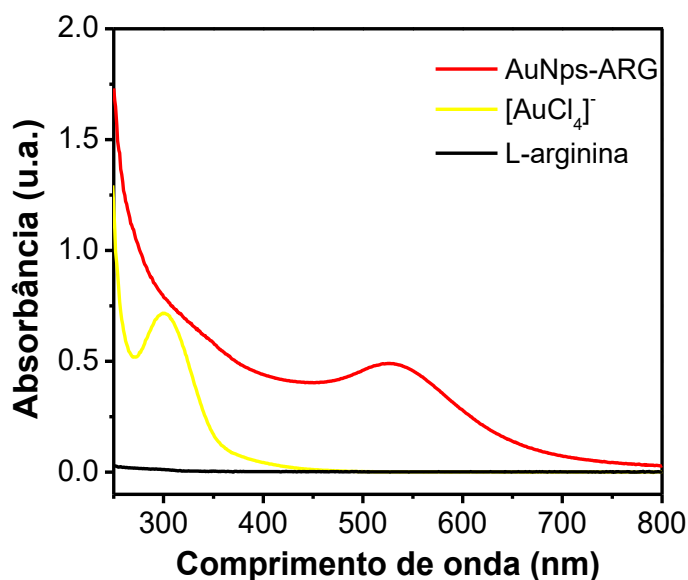
Nota: As moléculas de ARG foram representadas levando-se em conta a forma predominantemente existente em pH 11,0 (pH empregado no processo de síntese).

Fonte: Adaptado da referência [171].

É importante mencionar, ainda, a possibilidade de ocorrência de interação entre a ARG e os íons $[\text{AuCl}_4]^-$, antes da reação de redução propriamente dita acontecer. Pode-se assumir, por exemplo, que em um primeiro momento o complexo precursor $[\text{AuCl}_4]^-$ pode ter sofrido reações de troca de ligante com as moléculas de ARG presentes no meio reacional, formando derivados contendo de uma a quatro moléculas do aminoácido coordenadas ao centro metálico. Esta afirmação está de acordo com o trabalho de Glišić; Rychlewska e Djuran (2012) [173], no qual são relatadas reações de formação de complexos de Au(III) com aminoácidos (glicina, L-alanina, L-metionina, L-histidina e L-cisteína), peptídeos e proteínas. Experimentalmente, a possível coordenação de moléculas de ARG ao centro de Au(III) foi evidenciada pela alteração da coloração do meio, de amarelo intenso para amarelo-pálido, ao se adicionar as alíquotas da solução de ARG à solução do complexo $[\text{AuCl}_4]^-$. A formação de complexos de Au(III) com ARG pode ter, provavelmente, favorecido o processo de formação e estabilização das AuNPs após a adição do agente redutor D-glucose.

A espectroscopia na região do UV-VIS consiste em uma ferramenta essencial para o estudo e caracterização de AuNPs, uma vez que as mesmas apresentam a absorção referente à ressonância *plasmon* de superfície ocorrendo na região do espectro visível. O espectro de UV-VIS das AuNPs-ARG sintetizadas nas condições descritas é mostrado na Figura 2.10, assim como o espectro da solução do complexo $[\text{AuCl}_4]^-$ e da solução de ARG.

Figura 2.10 – Espectros de absorção na região do UV-VIS da suspensão de AuNPs-ARG (obtida com $[\text{ARG}] = 100,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $[\text{AuCl}_4]^- = 2,25 \text{ mmol L}^{-1}$ e $[\text{GLU}] = 0,50 \text{ mol L}^{-1}$, logo após o término da síntese) e de soluções de ARG $100,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$.

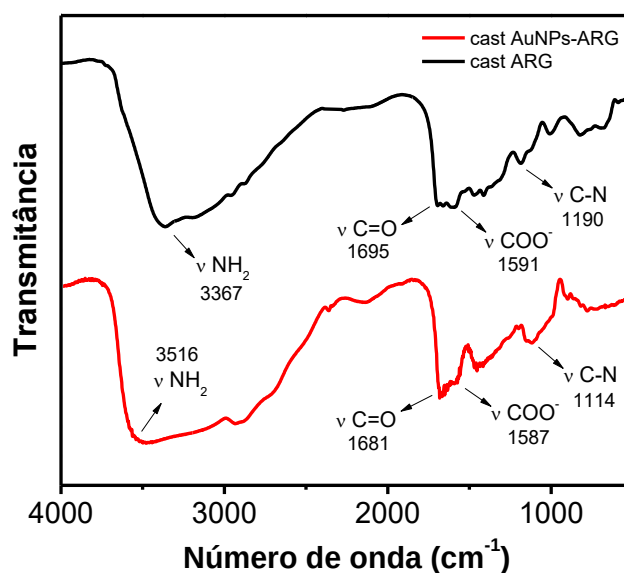


Fonte: O autor.

Verifica-se que a ARG não apresentou nenhuma banda dentro da faixa analisada, enquanto uma absorção em 301 nm foi observada para a solução do íon $[\text{AuCl}_4]^-$, a qual é referente às transições de transferência de carga ligante-metal (TCLM) [174]. A suspensão de AuNPs-ARG, por sua vez, mostrou uma banda em 526 nm, a qual pode ser atribuída ao efeito de SPR das AuNPs (banda *plasmon*). A ocorrência desta banda não apenas denota a presença das AuNPs, como também sugere que as partículas sintetizadas possuem propriedades ópticas típicas deste tipo de nanomaterial [175–177]. Verifica-se também que a banda referente ao precursor $[\text{AuCl}_4]^-$ teve sua intensidade diminuída no espectro das AuNPs-ARG, sugerindo o consumo dos íons $[\text{AuCl}_4]^-$ no processo de redução e formação das AuNPs.

A espectroscopia FTIR foi empregada a fim de se verificar a existência de interações entre a ARG e as AuNPs, comprovando assim o papel do aminoácido na síntese, estabilização e funcionalização das referidas nanoestruturas. Os espectros de FTIR de filmes *cast* de uma solução de ARG 100,0 mmol L⁻¹ e das AuNPs-ARG em substratos de silício são mostrados na Figura 2.11, com as atribuições relativas listadas na Tabela 4 [178].

Figura 2.11 – Espectros de absorção na região do infravermelho de filmes *cast* de ARG (100,0 mmol L⁻¹) e das AuNPs-ARG sobre substratos de silício.



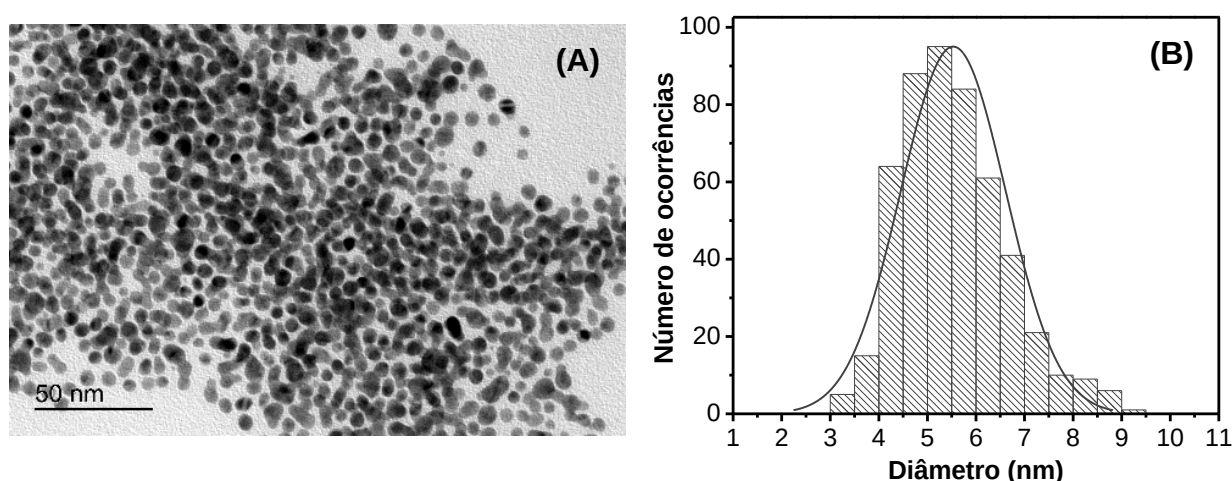
Fonte: O autor.

Verifica-se que as bandas apresentadas pelas AuNPs-ARG podem ser atribuídas às mesmas vibrações apresentadas pela estrutura da ARG. Entretanto, deslocamentos nos valores de frequência podem ser observados, sugerindo que interações existem entre a ARG e as AuNPs. De modo especial, verificam-se deslocamentos relativamente grandes para as bandas

referentes aos estiramentos do grupo NH_2 e da ligação C-N, o que pode ser tomado como uma consequência de mudanças nos momentos de dipolo das ligações de tais grupos após a ligação das moléculas de ARG à superfície metálica das AuNPs [179]. Isto evidencia que os mesmos podem estar envolvidos diretamente no processo de estabilização das AuNPs, possivelmente devido ao estabelecimento de interações de caráter covalente Au-N, como mencionado anteriormente.

A caracterização morfológica e a determinação do tamanho das AuNPs-ARG foram realizadas por MET. Verifica-se pelas imagens apresentadas na Figura 2.12A que as nanopartículas sintetizadas apresentaram uma morfologia esférica, e que as mesmas tendem a estar próximas umas das outras, como uma possível consequência da existência de interações entre as moléculas de ARG que circundam as AuNPs. Entre tais interações, deve-se destacar sobretudo a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos carboxilato e amino de nanopartículas vizinhas, assim como relatado no trabalho de Pu e colaboradores [180]. Pode-se verificar pelo histograma de distribuição de tamanho (Figura 2.12B, obtido a partir da contagem de 500 partículas) que as AuNPs-ARG se apresentaram homogêneas também no que diz respeito às suas dimensões, uma vez que uma distribuição bastante estreita (correspondente ao tamanho médio de $5,53 \pm 1,08$ nm) foi obtida.

Figura 2.12 – Imagens das AuNPs-ARG obtidas por MET nas magnificações (A) 100000 e (B) histograma de distribuição de tamanho obtido a partir da contagem de 500 partículas.



Fonte: O autor.

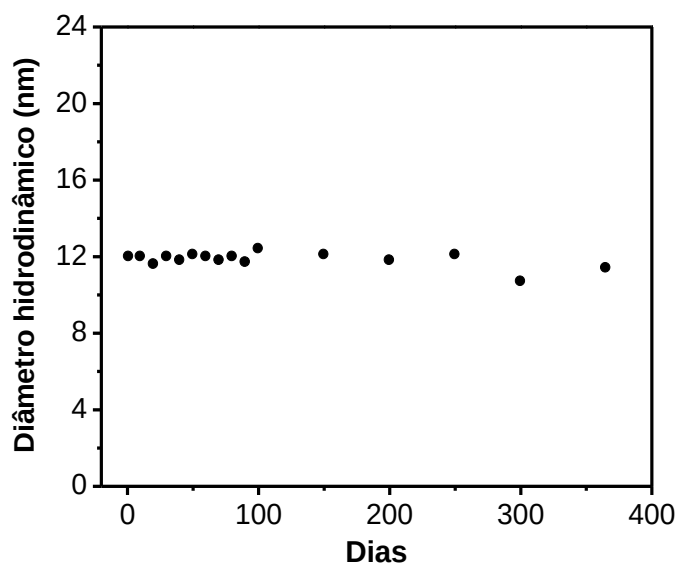
As AuNPs-ARG foram ainda caracterizadas por meio da determinação do valor do potencial zeta, o qual pode fornecer informação acerca da estabilidade de suspensões coloidais [181]. Para a suspensão em estudo obteve-se o valor de $-22,0$ mV, o que confirmou que as

partículas sintetizadas possuem predominantemente carga negativa, provavelmente devido à presença dos grupos carboxílicos desprotonados na estrutura da ARG (Figura 2.9).

Em geral, uma suspensão é considerada estável quando excede o intervalo de potencial zeta típico de suspensões instáveis (-30,0 mV a +30,0 mV) [182]. O valor encontrado para as AuNPs-ARG pode sugerir, portanto, que as nanopartículas obtidas não são estáveis em suspensão. Entretanto, medidas periódicas de DLS realizadas no intervalo de um ano mostraram que os diâmetros hidrodinâmicos das AuNPs-ARG apresentaram apenas pequenas variações durante este período ($11,8 \pm 0,4$ nm), o que denota a elevada estabilidade das nanopartículas sintetizadas (Figura 2.13). Confirma-se, deste modo, a eficiência da ARG também como um bom agente estabilizante para as partículas obtidas.

A estabilização alcançada pode ser resultante, principalmente, de uma combinação de efeitos estéricos e eletrostáticos exercidos pelo invólucro de ARG ao redor de cada nanopartícula (estabilização eletrostérica). Os efeitos estéricos podem ser relacionados ao volume das moléculas do aminoácido que envolvem cada partícula, ao passo que os efeitos eletrostáticos relacionam-se à repulsão entre os grupos COO^- existentes na extremidade das mesmas. Assim, a combinação destes dois efeitos permitiu que a estabilização das partículas recém-formadas fosse alcançada, o que impediu que as mesmas apresentassem coalescência. É importante mencionar que os valores de diâmetro de partícula obtidos por DLS foram levemente superiores aos obtidos nas análises de MET. Este comportamento pode ser justificado com base no fato de que a técnica de DLS fornece o tamanho aparente das nanopartículas em suspensão, incluindo a camada de hidratação e o conjunto de moléculas que estabilizam as mesmas, ao passo que a técnica de MET fornece os tamanhos efetivos das partículas sob análise, uma vez que não detecta tais estruturas circundantes [183].

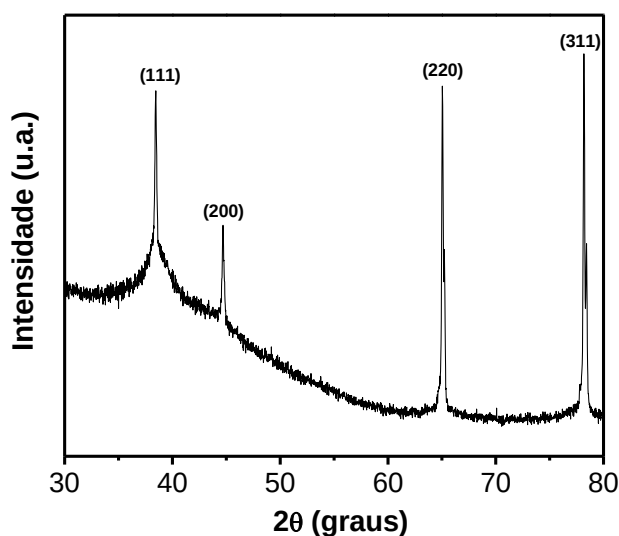
Figura 2.13 – Variação no diâmetro hidrodinâmico das AuNPs-ARG durante o período de um ano.



Fonte: O autor.

A natureza cristalina das AuNPs-ARG foi confirmada pela realização de análises de DRX, após liofilização. O difratograma resultante (Figura 2.14) mostrou picos em valores de 2θ iguais a $38,46^\circ$; $44,70^\circ$; $65,04^\circ$ e $78,18^\circ$, os quais correspondem aos planos (111), (200), (220) e (311), respectivamente, da estrutura cúbica de face centrada apresentada pelo Au metálico. Nota-se que os picos descritos se apresentaram levemente alargados, como é típico para cristais de dimensões nanométricas [184]. O valor do parâmetro de rede calculado a partir do pico de difração referente ao plano (111) foi igual a $4,0462 \text{ \AA}$, o que está em concordância com o valor reportado na literatura ($4,0792 \text{ \AA}$) [185].

Figura 2.14 – Difratograma de raios X das AuNPs-PFR após liofilização, com atribuição dos picos observados.

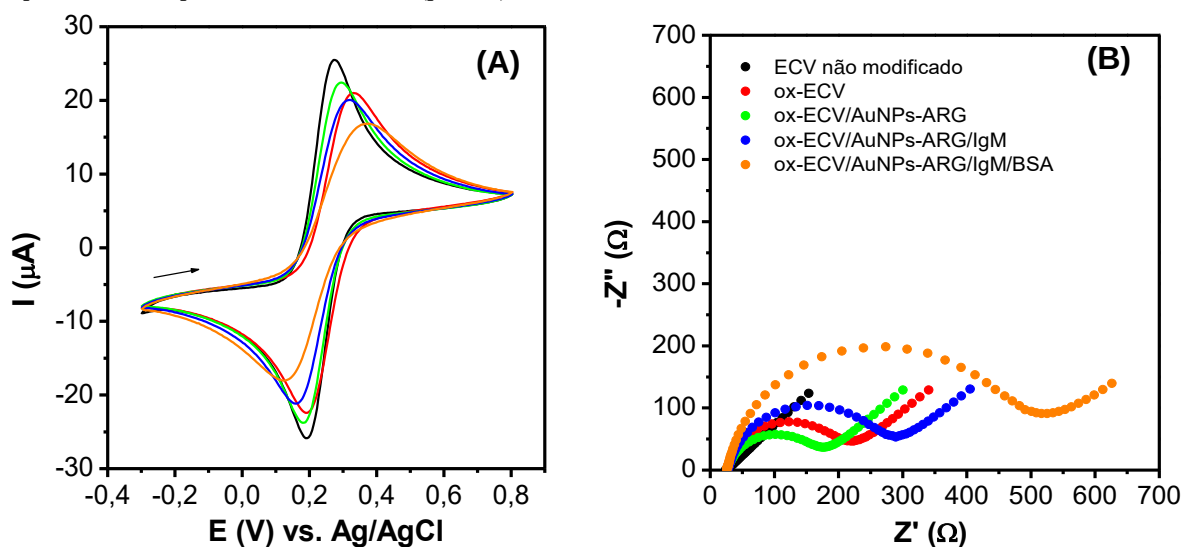


Fonte: O autor.

2.4.2 Caracterização Eletroquímica dos Imunossensores

As AuNPs-ARG sintetizadas neste trabalho foram aplicadas como elemento modificador do ox-ECV, a fim de se desenvolver uma plataforma para a imobilização dos anticorpos IgM anti-DHEA. Assim, cada uma das etapas da construção do imunossensor foi monitorada por meio da realização de medidas eletroquímicas de VC e EIE em meio da sonda $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. Buscou-se evidenciar, de tal maneira, as mudanças ocorridas nas propriedades interfaciais da superfície eletródica após sua modificação com as AuNPs-ARG e as biomoléculas estudadas, como uma maneira de se comprovar a ligação de tais estruturas à mesma. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 2.15 e na Tabela 2.3, e foram expressos como variações percentuais das correntes de pico anódico (ΔI_{pa}) e catódico (ΔI_{pc}) e da resistência à transferência de carga (ΔR_{ct}), tomando-se por base as correntes de pico e a R_{ct} observadas para o ECV não modificado ($n = 3$).

Figura 2.15 – (A) Voltamogramas cíclicos e (B) diagramas de Nyquist obtidos a cada etapa durante a construção dos imunossensores para DHEAS, em meio de solução equimolar de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,010 mol L⁻¹ preparada em tampão PBS 0,15 mol L⁻¹ (pH 7,4).



Fonte: O autor.

Tabela 2.3 – Valores médios de I_{pa} , ΔE_p e R_{ct} obtidos por VC e EIE em cada etapa da construção dos imunossensores para detecção de DHEAS ($n = 3$).

Etapa	I_{pa} (μA)	ΔE_p (mV)	R_{ct} (Ω)
ECV não modificado	29,8	83,0	21,5
ox-ECV	24,1	137,0	179,4
ox-ECV/AuNPs-ARG	26,0	117,0	141,8
ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM	23,0	161,0	241,0
ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM/BSA	18,8	243,0	460,7

De modo geral, pode-se verificar que um comportamento *quasi*-reversível para o processo redox da sonda eletroquímica ($Fe(CN)_6^{4-} \leftrightarrow Fe(CN)_6^{3-}$) foi obtido nas análises de VC em cada etapa da construção dos imunossensores (Figura 2.15A). Por outro lado, os diagramas de Nyquist apresentaram o semicírculo típico na região de frequências mais altas (o qual é diretamente relacionado à resistência à transferência de carga na interface eletrodo/solução, R_{ct}) e também a porção linear em frequências mais baixas (atribuída ao processo de difusão das espécies eletroativas em solução) (Figura 2.15B) [186].

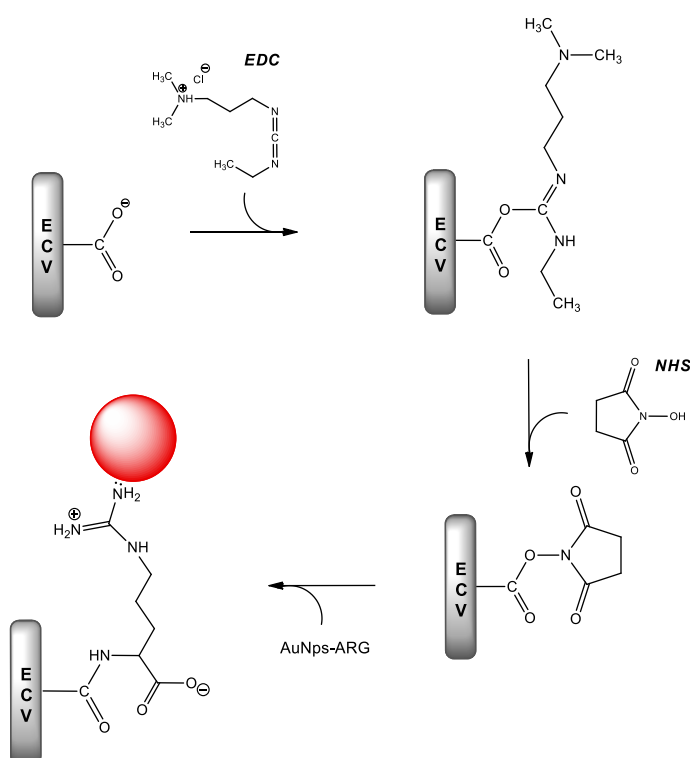
Inicialmente, os ECV foram submetidos a uma etapa de ativação eletroquímica, por meio de oxidação voltamétrica em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} . A oxidação de substratos de carbono vítreo previamente à sua aplicação pode conferir uma maior reprodutibilidade ao seu desempenho eletroquímico, assim como uma maior atividade eletroquímica [187]. Além disso, o processo de oxidação pode proporcionar a criação de grupos funcionais na superfície eletródica, tais como grupos carbonílicos e carboxílicos [188–190], os quais, por sua vez, podem interagir de modo mais efetivo com agentes modificadores a serem posteriormente imobilizados sobre a mesma. Experimentalmente, observou-se que, após a etapa de ativação eletroquímica, o ECV apresentou uma diminuição nos valores de I_{pa} , assim como significativos aumentos no valor de ΔE_p e R_{ct} , comparando-se com o ECV sem modificação. Isto pode ser atribuído à formação de grupos funcionais oxidados na superfície do eletrodo, sobretudo grupos carboxílicos, os quais podem sofrer desprotonação ($pK_a \sim 4,0$) e tornar-se negativamente carregados, dificultando a aproximação dos íons $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ e consequentemente o processo de transferência eletrônica na interface eletrodo/solução.

Após a modificação do ox-ECV com as AuNPs-ARG, um aumento no valor de I_{pa} foi observado concomitantemente a uma diminuição no valor de ΔE_p e R_{ct} (Figura 2.15), o que pode ser tomado como uma consequência direta da presença das AuNPs-ARG imobilizadas sobre o ox-ECV. Devido a propriedades como elevada condutividade elétrica, elevada área superficial e atividade catalítica [10,50], as AuNPs-ARG foram capazes de facilitar o processo

de transferência eletrônica na superfície do ox-ECV, o que é verificado pela maior reversibilidade do processo descrita anteriormente. A imobilização das AuNPs-ARG sobre o ox-ECV ocorreu pelo estabelecimento de ligações covalentes do tipo amida, as quais ocorreram entre os grupos carboxilatos da superfície eletródica e os grupos amino das AuNPs-ARG a partir da utilização dos agentes de ligação EDC e NHS [191].

Neste processo, moléculas de EDC reagem primeiramente com os grupos COO^- do ox-ECV para formar intermediários *o*-acilisourea, os quais podem reagir com os grupos aminos disponíveis das AuNPs-ARG e possibilitar assim a união destas duas estruturas por meio de uma ligação amida estável. Entretanto, devido à sua alta instabilidade, o intermediário *o*-acilisourea é também susceptível a sofrer hidrólise, o que impede que o mesmo reaja com os grupos amino para a formação da ligação amida. Para que isto fosse evitado, a fim de se garantir uma maior eficiência para o processo, foi empregada a reação com o composto orgânico NHS. Este é capaz de reagir com o intermediário mencionado para fornecer grupos funcionais contendo um derivado de éster na superfície eletródica, o qual é menos propício a sofrer hidrólise, mas pode facilmente sofrer um ataque nucleofílico por parte dos grupos amino das AuNPs-ARG para formar uma ligação amida estável (Figura 2.16) [191].

Figura 2.16 – Mecanismo proposto para o processo de ativação química dos grupos carboxílicos da superfície oxidada do ECV pelos agentes de ligação EDC e NHS, seguido pela ligação ao nanocompósito AuNPs-ARG (para maior clareza, a estrutura das AuNPs-ARG foi representada parcialmente).



Fonte: O autor.

A seguir, moléculas de anticorpos monoclonais IgM anti-DHEA foram imobilizadas sobre o ox-ECV/AuNPs-ARG. Os grupos carboxílicos existentes na extremidade das cadeias Fc das moléculas de IgM foram primeiramente ativados com uma mistura de EDC e NHS [192], a fim de que os mesmos pudessem posteriormente ligar-se covalentemente (via ligação amida) aos grupos amino presentes nas moléculas de ARG das AuNPs-ARG. A imobilização dos anticorpos orientada segundo as cadeias Fc, que é alcançada por meio da utilização dos agentes de ligação EDC e NHS, pode melhorar a sensibilidade e seletividade dos imunossensores desenvolvidos, uma vez que as cadeias Fab contendo os sítios de ligação ao antígeno ficam expostas e disponíveis para o evento de reconhecimento e formação do imunocomplexo [192].

A Figura 2.15 revela que uma diminuição nos valores de I_{pa} e aumentos no ΔE_p e na R_{ct} foram observados após a ligação das moléculas de IgM sobre o ox-ECV/AuNPs-ARG. Este comportamento está de acordo com o comportamento esperado, uma vez que os anticorpos imobilizados formam uma camada proteica que parcialmente bloqueia a superfície dos eletrodos, dificultando o processo de transferência eletrônica da sonda eletroquímica na interface eletrodo/solução.

Mesmo após a devida imobilização das moléculas de IgM anti-DHEA no ECV modificado com as AuNPs-ARG, é possível que tenham restado porções da superfície do mesmo que não tenham sido efetivamente ocupadas pelos anticorpos. Dada a presença de grupos amino protonados nas AuNPs-ARG, tais sítios não-específicos de ligação poderiam, por exemplo, interagir diretamente com as moléculas negativamente carregadas do hormônio DHEAS e levar a interpretações errôneas da resposta eletroquímica gerada pelo imunossensor. Assim, a fim de que a influência destes sítios não-específicos de ligação seja minimizada, ou até mesmo eliminada, a BSA foi imobilizada sobre os eletrodos como etapa final da construção dos imunossensores. Este processo foi acompanhado por uma nova diminuição na I_{pa} e um novo incremento no valor de ΔE_p e R_{ct} (Figura 2.15). Tal comportamento comprova que existiam sítios na superfície do ECV não ocupados pelas moléculas de IgM, e que foram preenchidos pela proteína adicionada.

2.4.3 Otimização da Preparação dos Imunossensores e da Realização dos Imunoensaios para DHEAS

O estabelecimento das melhores condições experimentais para a preparação dos imunossensores e para a realização dos imunoensaios para determinação do hormônio DHEAS foi realizado empregando-se técnicas multivariadas de otimização. Tais métodos têm por

objetivo avaliar e/ou otimizar determinado produto ou processo, a partir da realização do menor número de experimentos necessários para se extrair o máximo de informação dos dados coletados. Para este fim, todas as variáveis relevantes (também denominadas fatores) são alteradas de maneira simultânea em um conjunto de experimentos pré-determinados, de modo que os resultados obtidos são utilizados para a construção de modelos matemáticos que descrevem o comportamento do sistema dentro da região experimental investigada [193].

Entre as principais vantagens em se utilizar métodos multivariados de otimização frente aos tradicionais métodos univariados (onde cada fator é otimizado de maneira independente), podem ser citadas: (i) a avaliação da existência de interações entre as variáveis, as quais muitas vezes possuem um impacto bastante significativo sobre o resultado final, e são identificadas somente ao se estudar as variáveis de maneira simultânea; (ii) a construção de modelos empíricos, os quais permitem gerar uma superfície que descreve como a propriedade de interesse varia em função da variação dos níveis dos fatores (superfície de resposta); (iii) a economia de tempo e de recursos, assim como a minimização da geração de resíduos, uma vez que um menor número de experimentos é necessário para se chegar ao objetivo traçado inicialmente, seja este de apenas se avaliar a influência de cada variável estudada sobre a resposta de interesse, ou ainda de se otimizar o processo como um todo, chegando-se na condições experimentais ideais para o sistema em estudo [193,194].

Valendo-se das vantagens mencionadas no parágrafo anterior, duas ferramentas estatísticas multivariadas foram selecionadas para se otimizar as condições de preparação dos imunossensores e de determinação do biomarcador DHEAS: inicialmente, um planejamento fatorial completo para a triagem das variáveis, seguido por metodologia de superfície de resposta (MSR) para otimização do dispositivo e das condições dos imunoenaios.

2.4.3.1 Triagem das variáveis

Considerando-se que o desempenho analítico de um imunossensor eletroquímico está intimamente relacionado às diferentes variáveis envolvidas na sua preparação e durante a realização dos imunoenaios, três fatores foram selecionados para o processo de otimização do imunossensor para DHEAS: concentração da solução dos anticorpos IgM anti-DHEA ([IgM]), tempo de incubação dos eletrodos na solução dos anticorpos ($\text{tempo}_{\text{inc}}$) e temperatura de realização do imunoenaios (T).

Inicialmente, uma triagem (*screening*) das variáveis mencionadas foi executada, como uma maneira de se avaliar a influência das mesmas (seja de modo individual ou de modo

simultâneo) sobre a resposta de interesse. A resposta estudada consistiu na variação percentual da R_{ct} após a realização de imunoensaios (tomada como um indicativo do desempenho analítico do imunossensor) na presença de uma concentração fixa de DHEAS igual a $150 \mu\text{g dL}^{-1}$. Para a realização do presente estudo, empregou-se um planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata no ponto central, no qual as variáveis mencionadas foram estudadas em dois níveis: baixo (-) e alto (+), e as réplicas no ponto central foram empregadas para o cálculo da estimativa do desvio (erro experimental). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.4.

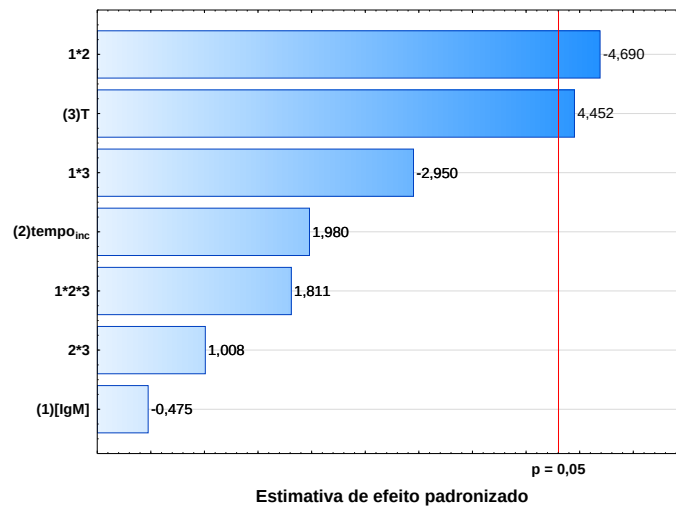
Tabela 2.4 – Matriz experimental do planejamento fatorial 2^3 para triagem das variáveis envolvidas na preparação dos imunossensores e na realização dos imunoensaios para DHEAS ($150 \mu\text{g dL}^{-1}$).

[IgM]	tempo _{inc}	T	ΔR_{ct} (%)
-	-	-	104,7
+	-	-	137,6
-	+	-	132,1
+	+	-	117,4
-	-	+	134,8
+	-	+	132,8
-	+	+	156,3
+	+	+	133,2
0	0	0	103,0
0	0	0	100,7
0	0	0	93,1

Nota: Valores dos níveis das variáveis: (i) [IgM] = 1,0 (-); 5,5 (0) e 10,0 (+) $\mu\text{g mL}^{-1}$; (ii) tempo_{inc} = 30 (-), 60 (0) e 90 (+) minutos; e (iii) T = 27 (-); 32 (0) e 37 (+) °C.

O tratamento estatístico dado aos dados obtidos com o planejamento fatorial mostrou que as variáveis que obtiveram efeito significativo com 95% de confiança sobre a resposta de interesse foram a T, na forma de um efeito principal, e a [IgM] e o tempo_{inc}, envolvidas em uma interação de segunda ordem ($p > 0,05$). Por meio do diagrama de Pareto apresentado na Figura 2.17, verifica-se que as variáveis [IgM] e tempo_{inc} não apresentaram efeitos significativos quando analisadas separadamente. Entretanto, ambas tornam-se significativas quando avaliadas na forma do efeito de interação, o qual inclusive foi o primeiro em ordem de importância.

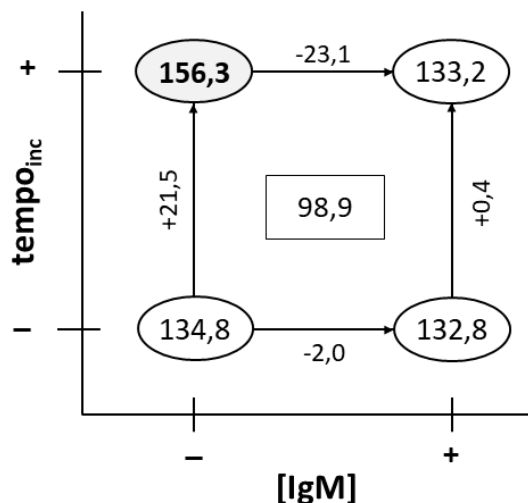
Figura 2.17 – Diagrama de Pareto para os efeitos padronizados resultantes da triagem das variáveis via planejamento fatorial completo 2^3 (95% de confiança).



Fonte: O autor.

Pode-se verificar ainda na Figura 2.17 que o efeito principal da temperatura apresentou sinal positivo, sugerindo que uma maior ΔR_{ct} é obtida quando esta variável está ajustada em seu nível alto (+), ou seja, 37 °C. Por outro lado, o fato da interação $[IgM]*tempo_{inc}$ ter resultado em um efeito de sinal negativo sugere que, para a obtenção de uma maior resposta, as variáveis envolvidas devem estar ajustadas em níveis opostos. Isto pode ser mais bem entendido ao se analisar a interpretação geométrica da interação em questão, a qual é apresentada na Figura 2.18, e contém as respostas obtidas ao se empregar a T ajustada em seu nível alto (37 °C) e a média das respostas obtidas nas condições referentes ao ponto central (centro da Figura 2.18).

Figura 2.18 – Interpretação geométrica do efeito de interação de segunda ordem $[IgM]*tempo_{inc}$.



Fonte: O autor.

É possível observar que existe uma tendência de aumento no valor de ΔR_{ct} ao se passar do nível baixo (-) para o nível alto (+) na variável tempo_{inc}, ao passo que a tendência oposta é verificada ao se realizar a mesma variação para a variável [IgM]. Pode-se notar também que, ao se fixar a [IgM] no nível baixo (-) e variando-se o tempo_{inc} do menor para o maior nível, ocorre um aumento de +21,5% na ΔR_{ct} . Porém, fixando-se a [IgM] no nível superior e realizando-se a mesma variação de níveis para o tempo_{inc}, a mesma tendência de acréscimo não é observada, uma vez que neste caso observa-se um incremento na ΔR_{ct} de apenas +0,4%. Deste modo, verifica-se que o efeito da [IgM] sobre a resposta de interesse depende diretamente do tempo de incubação empregado.

O comportamento observado pode ser entendido com base no fato de que, provavelmente, um maior tempo de incubação do ox-ECV/AuNPs-ARG na solução dos anticorpos é necessário para que as moléculas de IgM liguem-se via ligação amida às AuNPs-ARG imobilizadas. Por outro lado, uma menor [IgM] pode favorecer a formação de arranjos mais organizados na superfície do ox-ECV/AuNPs-ARG, o que pode levar a uma maior estabilidade do conjunto e reprodutibilidade de resposta. Assim, para que uma maior variação de ΔR_{ct} seja obtida, e um melhor desempenho analítico do dispositivo seja consequentemente alcançado, é necessário se empregar a [IgM] no nível baixo (-) ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o tempo_{inc} ajustado em seu nível alto (+) (90 minutos). Além disso, e como já sugerido anteriormente, os imunoensaios devem ser realizados nestas condições a 37 °C, para que então uma maior sensibilidade do imunossensor possa ser observada.

Pode-se verificar que um maior valor de ΔR_{ct} foi obtido nas condições [IgM] = $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, tempo_{inc} = 90 minutos e T = 37 °C. Nestas condições, a maior variação de sinal observada pode ser atribuída a uma imobilização mais efetiva das moléculas de IgM sobre o ECV oxidado e modificado pelas AuNPs-ARG, e também de um maior reconhecimento do hormônio DHEAS pelas mesmas.

2.4.3.2 Metodologia de superfície de resposta

De acordo com os resultados obtidos durante a triagem das variáveis, constatou-se que as variáveis [IgM] e tempo_{inc} foram as mais importantes para a obtenção de uma maior resposta, seguido pela temperatura. Assim, para dar continuidade ao processo de otimização, as duas primeiras variáveis foram selecionadas, optando-se por fixar a temperatura dos imunoensaios no valor de 37 °C. Os imunoensaios foram realizados empregando uma concentração de DHEAS fixa em $150 \mu\text{g dL}^{-1}$, assim como na triagem das variáveis.

Nesta etapa da otimização foi empregada a metodologia de superfície de resposta por meio da realização de um planejamento 2^2 do tipo composto central, com ponto central em triplicata. Neste planejamento, as variáveis [IgM] e tempo_{inc} foram avaliadas em cinco níveis cada uma, correspondentes aos níveis codificados (-1,41), (-1), (0), (+1) e (+1,41). Considerando-se os resultados obtidos na triagem, optou-se nesta etapa por avaliar a região experimental ao redor da melhor condição observada no primeiro planejamento ([IgM] = 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e tempo_{inc} = 90 minutos). Assim, a condição mencionada foi tomada como o ponto central do planejamento composto central, estabelecendo-se os novos níveis das variáveis a partir desta condição. A temperatura dos imunoenaios foi mantida fixa em 37 °C devido ao fato de que uma possível extrapolação desta para valores mais altos poderia acarretar processos de desnaturação proteica, com a consequente perda da atividade biológica dos anticorpos IgM. A matriz experimental é mostrada na Tabela 2.5, juntamente com os resultados obtidos em cada ensaio.

Tabela 2.5 – Matriz experimental do planejamento fatorial 2^2 composto central empregado para otimização das condições de preparação do imunossensor para DHEAS (150 $\mu\text{g dL}^{-1}$).

[IgM]	tempo _{inc}	ΔR_{ct} (%)
-	-	121,7
+	-	127,1
-	+	166,7
+	+	133,5
0	0	156,3
0	0	154,2
0	0	160,1
-1,41	0	158,4
+1,41	0	141,8
0	-1,41	104,9
0	+1,41	99,0

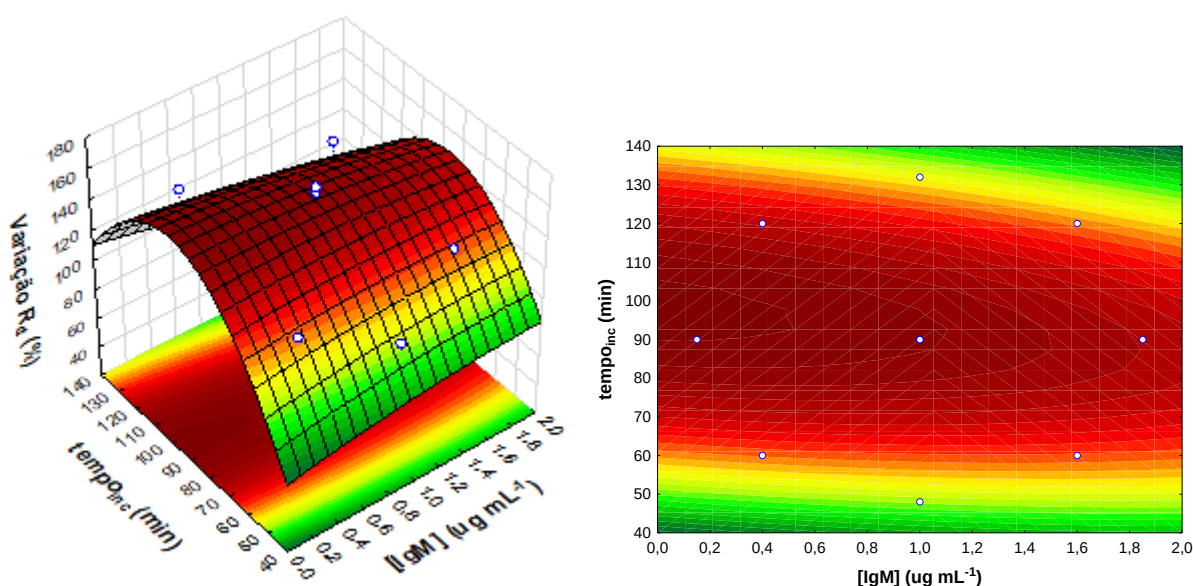
Nota: Valores dos níveis das variáveis: (i) [IgM] = 0,15 (-1,41); 0,4 (-); 1,0 (0); 1,6 (+) e 1,85 (+1,41) $\mu\text{g mL}^{-1}$; (ii) tempo_{inc} = 48 (-1,41); 60 (-); 90 (0); 120 (+); e 132 (+1,41) minutos.

Os resultados obtidos a partir deste planejamento foram ajustados a um modelo matemático quadrático, no qual a resposta de interesse (ΔR_{ct}) é representada em função das variáveis estudadas ([IgM] e tempo_{inc}). O modelo gerado, o qual é mostrado a seguir, contém termos lineares e quadráticos, assim como o produto dos termos lineares.

$$\Delta R_{ct} = 112,45 + 29,09 \times [IgM] - 3,89 \times [IgM]^2 + 5,63 \times tempo_{inc} - 0,03 tempo_{inc}^2 - 0,32 \times [IgM] \times tempo_{inc}$$

A superfície de resposta e o gráfico de curvas de nível correspondentes ao modelo ajustado são mostrados na Figura 2.19.

Figura 2.19 – (A) Superfície de resposta e (B) gráfico de curvas de nível resultantes da otimização dos imunossensores para DHEAS, em função das variáveis [IgM] e tempo_{inc} (T mantida constante em 37 °C).



Fonte: O autor.

Analisando-se a Figura 20(A), verifica-se que, dentro do intervalo em que as variáveis $[IgM]$ e $tempo_{inc}$ foram avaliadas, o valor da ΔR_{ct} passa por uma região de máximo (área vermelho-escura do gráfico de superfície de resposta), a qual corresponde à região experimental ótima para a preparação dos imunossensores para DHEAS à base das AuNPs-ARG. Além disso, pode-se observar no gráfico de curvas de nível (Figura 20(B)) que nesta região encontra-se o ponto central do planejamento, cujas condições foram então adotadas como os valores ótimos para a preparação dos imunossensores: $[IgM] = 1,0 \mu g mL^{-1}$ e $tempo_{inc} = 90$ min, com os imunoensaios realizados a 37 °C.

A fim de se avaliar a significância do modelo quadrático gerado pela MSR e se verificar se o mesmo apresenta um bom ajuste aos dados experimentais obtidos, realizou-se a análise de variância (ANOVA), cujos resultados são apresentados na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 – Resultados da ANOVA do modelo quadrático obtido para a construção do imunossensor para DHEAS.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F (calculado)	F (crítico)
Regressão	4101,44	5	820,29	$MS_{\text{Reg}}/MS_{\text{Res}}$ = 19,70	$F_{5,5} = 5,05$
Resíduos	208,18	5	41,64		
Falta de ajuste	374,99	3	125,00	$MS_{\text{LOF}}/MS_{\text{PE}}$ = 13,98	$F_{3,2} = 19,16$
Erro puro	17,89	2	8,94		
Total	4702,50	10			

Máxima variação explicável: $R^2 = 0,9164$; variação explicada: $\text{Adj-}R^2 = 0,8329$; MS_{Reg} : média quadrática da regressão; MS_{Res} : média quadrática dos resíduos; MS_{LOF} : média quadrática da falta de ajuste; MS_{PE} : média quadrática do erro puro.

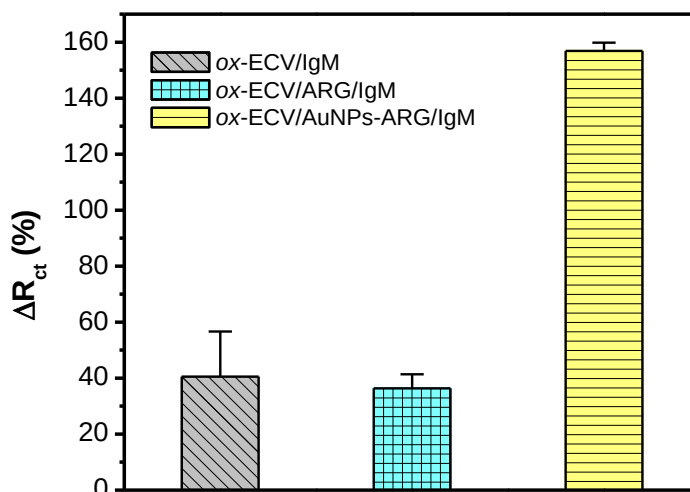
Verificou-se que o modelo resultante apresentou regressão significativa ao nível de confiança de 95% ($F_{\text{Reg}} = 19.70 > F_{5,5,95\%} = 5.05$), e que a variação explicada pelo modelo foi razoavelmente próxima da máxima variação explicável ($R^2 = 0.9164$; $\text{Adj-}R^2 = 0.8329$). Além disso, não houve evidência de falta de ajuste ($F_{\text{faj}} 13,98 < F_{3,2,95\%} = 19,16$), e este resultado foi corroborado pelo teste de normalidade realizado com os resíduos ($p > 0,05$). Assim, confirma-se que o modelo quadrático proposto pode explicar de maneira satisfatória os dados experimentais obtidos, sendo capaz de prever com uma confiabilidade de 83,3% o comportamento da variável dependente (resposta de interesse, ΔR_{ct}) frente às variáveis independentes estudadas ([IgM] e tempo_{inc}). Por fim, é importante ressaltar que os valores de R resultantes da ANOVA estão compreendidos dentro da faixa aceitável para dados obtidos a partir de experimentos com material biológico [195].

2.4.4 Avaliação da Influência das AuNPs-ARG na Detecção de DHEAS

A fim de se avaliar a influência das AuNPs-ARG na resposta gerada pelo imunossensor após a realização dos imunoenaios, um estudo comparativo foi realizado empregando três diferentes configurações do imunossensor para DHEAS: (i) imobilização direta das moléculas de IgM sobre a superfície do ox-ECV (ox-ECV/IgM); (ii) ligação da IgM sobre moléculas de ARG imobilizadas previamente sobre o ox-ECV (ox-ECV/ARG/IgM); e (iii) imobilização da IgM sobre as AuNPs-ARG (ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM). Em todos os casos, os sítios não ocupados do ECV foram bloqueados com BSA. Para cada configuração, imunoenaios na presença de $150 \mu\text{g dL}^{-1}$ de DHEAS foram realizados a 37°C , empregando

EIE ($n = 3$). As variações percentuais na R_{ct} após a realização das imunorreações são representadas graficamente na Figura 2.20.

Figura 2.20 – Variações percentuais da R_{ct} (ΔR_{ct}) após a realização de imunossaios com diferentes configurações do imunossensor na presença de $150 \mu\text{g dL}^{-1}$ de DHEAS ($n = 3$).



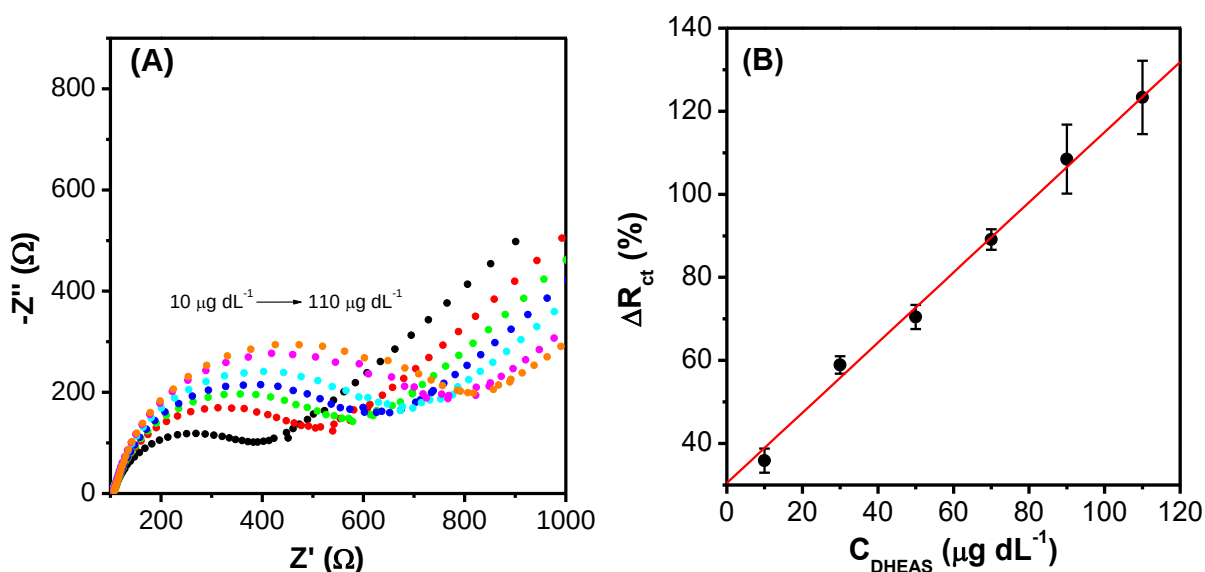
Fonte: O autor.

Verifica-se que os valores de ΔR_{ct} obtidos para o imunossensor ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM foram bastante superiores àqueles obtidos para as duas outras configurações (ox-ECV/IgM e ox-ECV/ARG/IgM). Estas maiores variações sugerem que as AuNPs-ARG contribuíram para uma imobilização mais efetiva das moléculas dos anticorpos, permitindo que uma maior quantidade de sítios de ligação ao antígeno estivesse disponível para a detecção do hormônio DHEAS. Além disso, a incorporação das AuNPs-ARG possibilitou um aumento na área superficial do eletrodo, favorecendo que um maior número de moléculas de IgM pudesse ser imobilizado neste caso. Nas demais configurações, os anticorpos possivelmente se ligaram à plataforma apenas por interações mais fracas comparadas à ligação covalente (como forças de van der Waals e ligações de hidrogênio), ocorrendo sua remoção nas etapas de lavagem ou ainda sua lixiviação para o eletrólito suporte durante a realização das medidas eletroquímicas, ou ainda foram imobilizados em quantidade menor, levando às menores variações de sinal observadas. Pode-se afirmar, portanto, que a utilização das AuNPs-ARG certamente conferiu ao dispositivo uma maior estabilidade e sensibilidade para a aplicação em imunossaios para detecção de DHEAS.

2.4.5 Curvas Analíticas

Uma vez otimizadas as condições para a preparação dos imunossensores e concluída sua caracterização, curvas analíticas foram obtidas a partir da realização de imunoenaios a 37 °C em concentrações crescentes de DHEAS, na faixa de 10 a 110 $\mu\text{g dL}^{-1}$. Monitorou-se as variações no valor de ΔR_{ct} tendo-se por base a R_{ct} apresentada pelo imunossensor na ausência de DHEAS. Tais experimentos foram realizados em triplicata ($n = 3$, utilizando-se três eletrodos independentes), e os resultados obtidos são mostrados na Figura 2.21. Como pode ser observado, as curvas analíticas indicaram um aumento linear do valor de ΔR_{ct} com o aumento da concentração de DHEAS dentro da faixa estudada, segundo a equação: $\Delta R_{ct} (\%) = 30,48 + 0,84 C_{DHEAS} (\mu\text{g dL}^{-1})$; $R = 0,992$.

Figura 2.21 – (A) Diagramas de Nyquist obtidos com o imunossensor ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM na presença de diferentes concentrações de DHEAS (0,0; 10,0; 20,0; 50,0; 70,0; 90,0; e 110,0 $\mu\text{g dL}^{-1}$) de DHEAS, em tampão PBS 0,15 mol L^{-1} pH 7,4 contendo 5,0 mmol L^{-1} de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. (B) Curva analítica obtida com o imunossensor para detecção de DHEAS ($n = 3$).



Fonte: O autor.

O LD do imunossensor para DHEAS foi a seguir determinado a partir da seguinte equação [165,166]:

$$LD = \frac{3 \times DP}{b}$$

onde DP é o desvio padrão do intercepto com o Y de três curvas e b é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica construída a partir de três curvas independentes (Figura 21). Para o imunossensor proposto, obteve-se um LD igual a 7,4 $\mu\text{g dL}^{-1}$.

A Tabela 2.7 apresenta a faixa linear e valores de LD obtidos para a determinação de DHEAS empregando-se diferentes métodos previamente reportados. Embora o imunossensor ox-GCE/AuNPs-ARG/IgM possua um intervalo linear menor e LD maior do que em algumas técnicas citadas, deve-se ressaltar que os parâmetros analíticos obtidos podem ser considerados adequados para a detecção do biomarcador estudado em crianças visando-se o diagnóstico precoce de CCA pediátrico (níveis plasmáticos normais: 2 a 15 $\mu\text{g dL}^{-1}$ para pacientes na faixa de 1 a 5 anos; 5 a 50 $\mu\text{g dL}^{-1}$ para indivíduos na faixa de 5 a 11 anos [144]). Além disso, o imunossensor desenvolvido pode consistir também em uma ferramenta útil para o monitoramento do nível plasmático de DHEAS em pacientes portadores da mutação associada ao CCA (TP53), assim como uma alternativa para se avaliar possíveis casos de recorrência da doença.

Tabela 2.7 – Faixas lineares e valores de LD reportados para a determinação de DHEAS empregando diferentes métodos analíticos.

Método	Faixa linear ($\mu\text{g dL}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g dL}^{-1}$)	Referência
EFS/LC-QTrap/MS ¹	4,8 – 700,0	0,9	[196]
MEKC ²	800,0 – 1,0 x 10 ⁵	800,0	[197]
LC-MS/MS	0,0 – 737,0	36,8	[198]
HPLC-MS/MS	5,0 – 1000,0	0,5	[151]
ELISA	3,7 – 3685,0	7,4	[199]
Quimiluminescência	–	15,0	[200]
Radioimunoensaio	–	5,2	[201]
Condutância elétrica ³	0,0 – 36,8	1,6	[160]
VPD ⁴	0,25 – 10,0	0,4	[161]
EIE	10,0 – 150,0	7,4	Este trabalho [162]

Nota: ¹Extração em fase sólida/cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com analisador do tipo triplo-quadrupolo-*ion trap*; ²cromatografia eletrocínética capilar micelar; ³eletrodo de trabalho: eletrodo de ouro modificado com SAM de cisteamina e com anticorpos anti-DHEA; ⁴eletrodo de trabalho: dispositivo do tipo FET à base de grafeno modificado com aptâmero específico à DHEAS.

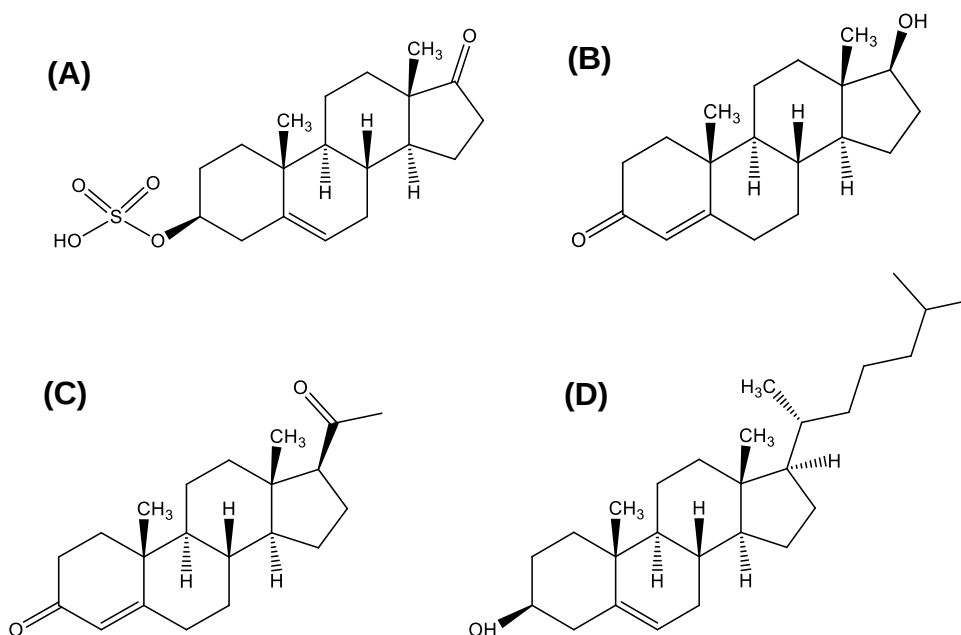
Em relação aos métodos eletroquímicos mencionados, ressalta-se que o presente trabalho emprega imunossensores construídos a partir de materiais de menor custo em comparação à estratégia proposta por Balaban e colaboradores (2019) (emprego de eletrodos de ouro modificados com SAM de cisteamina para a ligação de anticorpos anti-DHEA) [161], e um método de detecção mais simples comparado ao utilizado por Wang e colaboradores

(2015) (ensaio competitivo baseado em variações de condutância em dispositivos do tipo FET) [160].

2.4.6 Estudo de Interferentes

Devido à similaridade estrutural existente entre compostos esteroides, e uma vez que os mesmos podem estar presentes na corrente sanguínea de modo simultâneo, testes de seletividade do imunossensor desenvolvido são necessários. Por meio de tais testes, pode-se avaliar a especificidade do dispositivo em relação à DHEAS em particular, assim como verificar a influência de possíveis interferentes sobre as respostas eletroquímicas geradas pelo mesmo. Entre tais interferentes, pode-se citar os esteroides progesterona (PROG), testosterona (TEST) e colesterol (COL), os quais foram selecionados para a realização do presente estudo.

Figura 2.22 – Estruturas químicas da (A) DHEAS e de três possíveis interferentes esteroidais para o imunossensor desenvolvido: (B) TEST, (C) PROG e (D) COL.



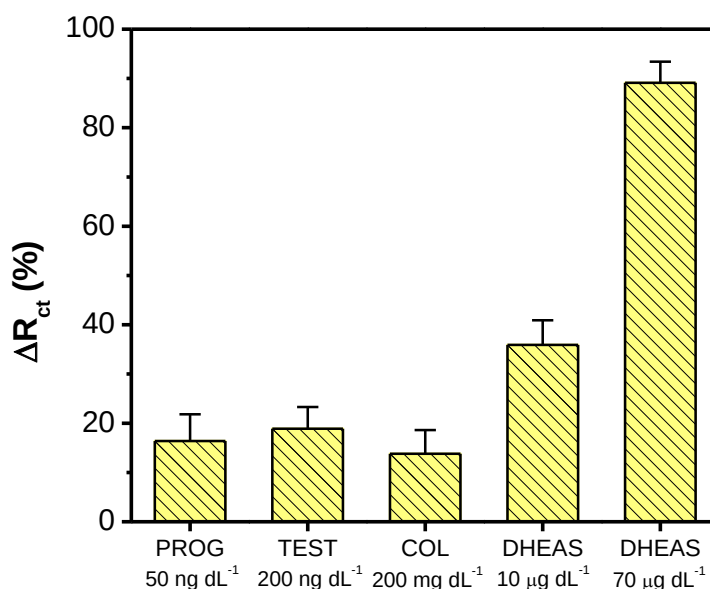
Fonte: O autor.

A literatura afirma que, para indivíduos do sexo masculino com idade de 10 a 11 anos, os níveis plasmáticos normais de testosterona costumam oscilar entre 7,0 a 130,0 ng dL⁻¹, enquanto que para indivíduos da mesma faixa etária do sexo feminino a faixa de referência média considerada como normal vai é de 7,0 a 44,0 ng dL⁻¹ [202]. As concentrações plasmáticas de progesterona, por sua vez, oscilam entre 10 a 36 ng dL⁻¹, em crianças na faixa de 5 a 11 anos

[203]. Para o colesterol, tem-se como um nível plasmático normal o valor de 170 mg dL^{-1} , para crianças de até 10 anos de idade [204]. Com base nestas informações, foram selecionadas concentrações de testosterona, progesterona e colesterol iguais a 200 ng dL^{-1} , 50 ng dL^{-1} e 200 mg dL^{-1} , respectivamente, para realização do presente estudo. Deste modo, as concentrações testadas para os interferentes estiveram próximas aos níveis plasmáticos máximos da faixa considerada como normal.

Os resultados obtidos com os imunoenaios realizados na presença de cada um dos possíveis interferentes foram então comparados aos obtidos previamente para 10 e $70 \text{ } \mu\text{g dL}^{-1}$ do biomarcador DHEAS, como mostrado na Figura 2.23.

Figura 2.23 – Variações percentuais na R_{ct} (ΔR_{ct}) obtidos por EIE com o imunossensor após imunoenaios na presença de DHEAS e dos interferentes PROG, TEST e COL.



Fonte: O autor.

Verificou-se que menores incrementos na R_{ct} foram observados após a incubação do imunossensor nas soluções de PROG, TEST e COL, comparado ao valor obtido na presença de DHEAS. As menores variações registradas sugerem que o imunossensor apresentou especificidade para a detecção do hormônio de interesse. Além disso, é válido destacar que os níveis estudados para os interferentes correspondem a concentrações relativamente altas para crianças, e que mesmo assim as variações observadas foram inferiores às resultantes do imunoenensaio para DHEAS. Assim, pode-se afirmar que o imunossensor foi capaz de determinar o biomarcador DHEAS, sem apresentar influência significativa de outros compostos esteroidais.

2.4.7 Estudos de Exatidão e Precisão

A fim de se avaliar os níveis de exatidão e precisão (reprodutibilidade) do ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM em relação à determinação do biomarcador DHEAS, bem como se verificar o possível efeito que uma matriz biológica ocasionaria na resposta gerada pelo dispositivo, amostras de soro fetal bovino foram fortificadas com diferentes concentrações de DHEAS e a seguir submetidas a imunoensaios por EIE com o imunossensor ($n = 3$ para cada concentração), com incubação a 37 °C. O nível de exatidão foi expresso como porcentagem de recuperação e %bias, enquanto a precisão foi expressa em termos de porcentagem de desvio padrão relativo entre as concentrações encontradas (%DPR). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.8. Pode-se verificar que o imunossensor proposto apresentou níveis de exatidão e de precisão adequados para a detecção de DHEAS, uma vez que porcentagens de recuperação satisfatórias foram obtidas (dentro do intervalo de 85,0-115,0%), assim como valores aceitáveis de %bias e %DPR (máximo de 15%) [205]. Além disso, pode-se afirmar que a matriz empregada (soro fetal bovino) não influenciou significativamente o processo de detecção e desempenho analítico do imunossensor.

Tabela 2.8 – Resultados do estudo de exatidão e precisão (reprodutibilidade) ($n = 3$ para cada concentração) para a detecção de DHEAS com o imunossensor impedimétrico ox-GCE/AuNPs-ARG/IgM.

C_{ad} ($\mu\text{g dL}^{-1}$)	C_{det} ($\mu\text{g dL}^{-1}$)¹	Recuperação (%)¹	Bias (%)¹	DPR (%)
30,0	31,6	105,3	5,33	3,99
70,0	71,7	102,4	2,43	9,82
110,0	104,0	94,5	5,45	9,98

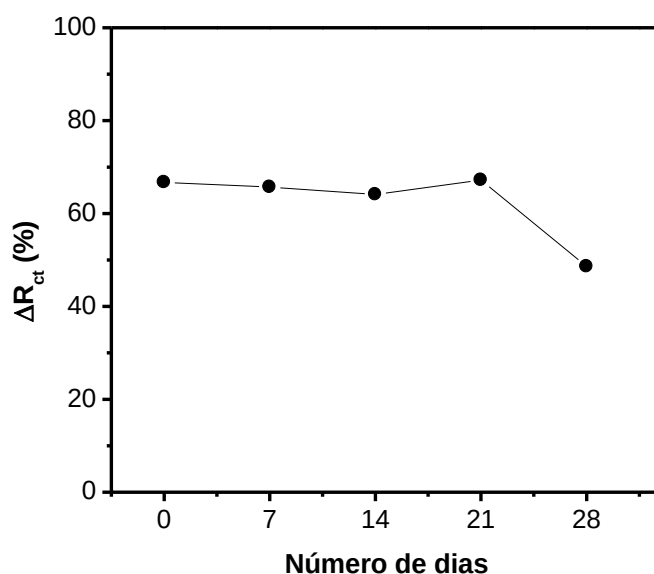
¹Média de três determinações.

2.4.8 Estudo da Estabilidade do Imunossensor

A estabilidade do imunossensor proposto foi avaliada a partir da realização de medidas de EIS para a detecção de DHEAS ao longo do período de um mês. Cinco imunossensores independentes foram preparados e testados na presença de 50 $\mu\text{g dL}^{-1}$ do biomarcador em quatro momentos: no dia da preparação, e com uma, duas, três e quatro semanas de estocagem a 4 °C. Verifica-se na Figura 2.24 que o valor inicial de ΔR_{ct} (66,7%) não variou significativamente no intervalo de três semanas (65,7%, 64,1% e 67,2% para uma, duas e três semanas de estocagem, respectivamente). Entretanto, após o período de um mês, o valor de ΔR_{ct} diminuiu (48,6%), possivelmente devido à desnaturação de parte das moléculas de IgM imobilizadas na superfície

do eletrodo. Deste modo, as respostas reprodutíveis obtidas inicialmente para o ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM evidenciam a estabilidade do imunossensor desenvolvido durante as três primeiras semanas a se contar a partir do dia de sua preparação.

Figura 2.24 – Variação nos valores de ΔR_{ct} obtidos para cinco imunossensores ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM independentes ao longo de 4 semanas de estocagem a 4 °C.



Fonte: O autor.

2.4.9 Determinação de DHEAS em Amostras Clínicas

A possibilidade de aplicação do imunossensor ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM para a determinação em amostras clínicas reais foi investigada por meio da realização de imunoensaios em amostras de plasma sanguíneo coletados de pacientes do Hospital Pequeno Príncipe (Curitiba, PR) portadores da mutação TP53 R337H. Os resultados obtidos por EIE empregando o imunossensor ($n = 3$ para cada concentração) são mostrados na Tabela 2.9, juntamente com os níveis plasmáticos de DHEAS determinados para cada amostra por quimioluminescência (método padrão).

Tabela 2.9 – Resultados para a detecção de DHEAS em amostras de plasma de pacientes obtidos por quimioluminescência e o imunossensor impedimétrico proposto.

Amostra	Quimioluminescência ($\mu\text{g dL}^{-1}$)	EIE ¹ ($\mu\text{g dL}^{-1}$)	DPR (%)	Erro relativo (%)
A	56,0	51,9	3,4	7,3
B	122,0	130,2	4,8	7,7
C	209,0	192,4	3,8	7,9

¹Média de três determinações.

Pode-se afirmar a partir dos dados contidos na Tabela 2.9, que os níveis plasmáticos de DHEAS determinados com o imunossensor desenvolvido estão em concordância com os obtidos pelo método de referência. Como uma maneira de se verificar a existência ou ausência de diferença estatística entre as concentrações de DHEAS obtidas com o imunossensor pela técnica de EIE e o método padrão, o teste *t*-pareado bicaudal foi aplicado aos resultados em questão. Verificou-se, a um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$), que não existe diferença estatística entre as concentrações de DHEAS determinadas por ambos os métodos, uma vez que o valor de *t* calculado foi inferior ao valor de *t* crítico ($t_{\text{calculado}} = -0,582 < t_{\text{crítico}} = 4,303$; $p(0,619) > 0,050$). Além disso, os baixos valores de %DPR indicam que o imunossensor apresentou uma boa reprodutibilidade nas determinações. Portanto, os resultados encontrados sugerem que o imunossensor ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM aliado à técnica de EIE apresenta um desempenho analítico promissor para a detecção futura de DHEAS em amostras de plasma sanguíneo.

2.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste trabalho, um imunossensor eletroquímico *label-free* foi desenvolvido para a detecção do esteroide DHEAS, um biomarcador de carcinoma de córtex adrenal pediátrico, em amostras clínicas. Este sistema foi desenvolvido a partir da imobilização de anticorpos IgM anti-DHEA sobre um ECV oxidado e modificado com nanopartículas de ouro funcionalizadas com o aminoácido L-arginina (ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM).

As AuNPs-ARG foram sintetizadas a partir de uma rota simples e que está de acordo com os princípios da química verde, por meio da redução do complexo $[\text{AuCl}_4]^-$ pelo monossacarídeo D-glucose na presença de ARG. As suspensões obtidas foram caracterizadas por técnicas espectroscópicas e morfológicas, tendo-se verificado um diâmetro médio igual a $5,53 \pm 1,08$ nm para as nanopartículas formadas. Além disso, verificou-se que as mesmas

apresentaram uma elevada estabilidade em suspensão, uma vez que não foram observadas variações significativas em seu diâmetro hidrodinâmico pelo período de um ano.

A plataforma constituída pelo ox-ECV e modificado com as AuNPs-ARG mostrou-se adequada para a imobilização de moléculas de IgM anti-DHEA via ligação amida entre os grupos amino da ARG e os grupos carboxílicos da cadeia Fc dos anticorpos. Após otimização das condições para preparação dos imunossensores e realização dos imunoensaios para DHEAS, a qual foi realizada de modo multivariado empregando-se planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta, verificou-se que as três variáveis estudadas ([IgM], tempo de incubação e temperatura do imunoensaios) obtiveram efeito significativo sobre a resposta de interesse (ΔR_{ct} após a imunorreacção) a um nível de confiança de 95%. Além disso, o modelo quadrático obtido apresentou um bom ajuste aos dados experimentais, tendo-se encontrado como condições ótimas para a construção dos imunossensores uma [IgM] igual a $1,0 \mu\text{g dL}^{-1}$ e um tempo de incubação de 90 minutos, além de aquecimento a 37°C para a realização dos imunoensaios.

Nas condições otimizadas, o ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM foi capaz de detectar o biomarcador empregando a técnica de EIE na faixa de 10 a $110 \mu\text{g dL}^{-1}$, com um LD adequado para propósitos clínicos igual a $7,4 \mu\text{g dL}^{-1}$. O imunossensor proposto apresentou ainda bons níveis de exatidão e precisão, além de ter-se mostrado satisfatoriamente específico para o biomarcador, o que possibilitou a sua quantificação em amostras de plasma sanguíneo de pacientes. O desempenho analítico promissor do dispositivo foi confirmado pelo fato de que os resultados encontrados na análise das amostras clínicas foram estatisticamente equivalentes aos obtidos com o método padrão para determinação de DHEAS (quimiluminescência). Neste sentido, pode-se afirmar que o ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM aliado à técnica de EIE consiste em uma ferramenta atrativa para o monitoramento de DHEAS em amostras reais, podendo auxiliar na realização de diagnósticos precoces de CCA, sobretudo em crianças. Ressalta-se que a presença das AuNPs-ARG conferiram à plataforma características atrativas como uma maior condutividade elétrica, maior área superficial, o que acarretou uma imobilização mais efetiva dos anticorpos e maior sensibilidade para o dispositivo. Por fim, é possível destacar que a estratégia de construção desenvolvida pode ser futuramente aplicada para a modificação de eletrodos descartáveis (como eletrodos de carbono impressos), de modo a viabilizar a sua utilização em sistemas de detecção *point-of-care*.

CAPÍTULO 3 – DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE INTERAÇÕES ENTRE ISOFORMAS DE APOLIPOPROTEÍNA E SEQUÊNCIAS DE DNA ASSOCIADAS À DOENÇA DE ALZHEIMER

3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.1 Doença de Alzheimer (DALz)

A doença de Alzheimer (DALz) consiste em uma doença cerebral neurodegenerativa que figura como a principal causa de demência (de 60-70% dos casos) em pacientes idosos acima de 65 anos [206,207]. Descrita pela primeira vez em 1907 por Alois Alzheimer [208], é inicialmente caracterizada pela perda de memória, e, à medida que a doença avança, é marcada por sintomas como limitações relacionadas à linguagem, desorientação, oscilações de humor e dificuldade na resolução de problemas [207,209].

A perda das funções cognitivas acaba por afetar marcadamente a habilidade do indivíduo de realizar atividades do cotidiano, e é consequência da progressiva destruição dos neurônios em regiões do cérebro envolvidas na realização de tais funções, o que, por sua vez, leva ao atrofiamento do órgão. Com a progressão da doença, neurônios em partes do cérebro responsáveis por funções corporais básicas e motoras (como o ato de engolir e caminhar) também são afetados, o que leva ao comprometimento severo do paciente, que passa a necessitar de cuidados incessantes. Apesar de apresentar sinais característicos, acredita-se que a DALz tenha início cerca de vinte anos ou mais antes dos primeiros sintomas surgirem, com apenas pequenas alterações no cérebro que são imperceptíveis para os indivíduos afetados [209].

Em 2017, cerca de 45 milhões de pessoas no mundo possuíam DALz, sendo que mais de 7 milhões de novos casos foram reportados no mesmo período [210]. Embora a doença se manifeste com frequência muito maior em indivíduos idosos com idade superior a 65 anos, cerca de 4-5% dos casos ocorre em pacientes com idade inferior à citada, o que se conhece como Alzheimer precoce [211].

Infelizmente, nenhuma das alternativas farmacológicas atualmente disponíveis para tratamento da demência causada pela DALz é capaz de parar o processo de destruição de neurônios que leva aos sintomas característicos da doença e que a torna letal [209]. Entretanto, diversos fármacos com o potencial de atenuar os sintomas e reduzir a progressão da doença têm sido propostos [212], incluindo o uso de estratégias imunoterapêuticas [213–215]. Somado a tais intervenções, cuidados referentes à alimentação e ao estilo de vida (incluindo a realização

de atividades físicas) têm mostrado serem pontos importantes tanto para a prevenção da DAz quanto para a potencialização dos resultados apresentados pelo tratamento farmacológico [212,216].

Até o momento, não existem métodos aprovados específicos que podem ser empregados para diagnóstico da DAz. Desta forma, profissionais fazem uso de uma variedade de ferramentas que podem ajudar a diagnosticar a doença. Tais estratégias incluem a obtenção de históricos médico-familiares do indivíduo, a realização de testes cognitivos e exames físicos e neurológicos e o imageamento cerebral numa tentativa de se detectar altos níveis de placas do peptídeo βA [209].

Por outro lado, a comunidade científica tem continuamente desenvolvido novos métodos com potencial de aplicação para o diagnóstico de DAz, os quais baseiam-se principalmente na detecção de biomarcadores como beta-amiloide (βA_{1-40} e βA_{1-42}) e formas fosforiladas da proteína tau (pTau), sobretudo em amostras de fluido cefalorraquidiano. Tais métodos envolvem o uso de técnicas como quimioluminescência [217], ELISA [218,219], microbalança de cristal de quartzo [220], ressonância *plasmon* de superfície [221] e técnicas eletroquímicas [222,223]. Interessantemente, o emprego de redes neurais baseadas na análise de imagens de ressonância magnética nuclear e de tomografia por emissão de pósitrons também foi reportado recentemente como uma promissora estratégia para diagnóstico da DAz [224].

3.1.2 Peptídeos e Proteínas Associados ao Desenvolvimento da DAz

Apesar dos esforços contínuos realizados durante anos de pesquisa, as causas primárias exatas da DAz ainda permanecem incertas [225]. Entretanto, há um consenso de que o desenvolvimento da doença pode estar associado principalmente à ocorrência de dois elementos proteicos cerebrais específicos: os peptídeos β -amiloide (βA) e formas hiperfosforiladas da proteína tau (pTau), os quais formam agregados tóxicos que se depositam no cérebro de pacientes acometidos pela DAz (placas senis extracelulares e emaranhados neurofibrilares intracelulares, respectivamente), levando progressivamente à morte das células neuronais [209].

3.1.2.1 Peptídeos βA

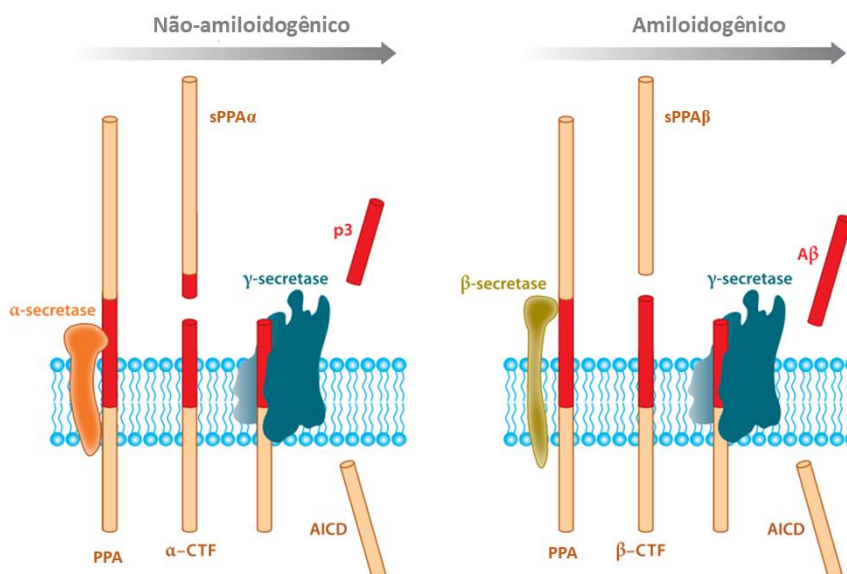
O acúmulo cerebral de peptídeos βA no meio extracelular na forma de placas senis é considerado o evento inicial que conduz aos danos neurológicos característicos da DAz. Esta

hipótese – denominada hipótese da cascata amiloide – foi postulada pela primeira vez no trabalho de Hardy e Higgins (1992) [226], e afirma que a deposição das referidas placas desencadeia uma série de eventos patológicos que incluem a ocorrência de danos sinápticos, hiperfosforilação da pTau (proteína associada aos microtúbulos) e formação de emaranhados neurofibrilares, culminado na morte celular e declínio cognitivo [226,227].

Os peptídeos β A são gerados a partir da clivagem proteolítica da denominada proteína precursora de amiloide (PPA) [206], proteína transmembrana contendo 770 aminoácidos expressa em altas quantidades em neurônios e que está envolvida em funções como crescimento e desenvolvimento neuronal, formação de sinapses e neuroplasticidade [228,229]. A produção destes peptídeos consiste em um processo fisiológico normal que é intensificado durante os eventos mencionados anteriormente. Além disso, os mesmos contribuem para a homeostase de lipídeos nas células neuronais a partir de sua ligação a moléculas de colesterol e transporte das mesmas [230]. A reciclagem ou degradação de tais fragmentos proteicos é predominantemente realizada em lisossomos [231].

A clivagem da PPA ocorre por meio de dois mecanismos, denominados não-amiloidogênicos e amiloidogênicos (Figura 3.1), os quais são catalisados por uma série de enzimas proteases, incluindo a α - e β -secretase (ADAM10 e BACE1, respectivamente) e o complexo enzimático de quatro proteínas denominado γ -secretase. O mecanismo não-amiloidogênico é mediado pela α - e γ -secretase e resulta na produção de fragmentos proteicos solúveis (sPPA α , p3 e AICD), enquanto que o amiloidogênico envolve reações mediadas pela β - e γ -secretase e tem os peptídeos β A e os fragmentos sPPA β e AICD como produtos [229,231].

Figura 3.1 – Mecanismos de clivagem da PPA mediados pelas enzimas α -, β - e γ -secretase.



Fonte: Adaptado da referência [231].

A clivagem mediada pelo complexo γ -secretase ocorre em diferentes sítios, o que resulta em uma população heterogênea de peptídeos β A no que diz respeito ao tamanho das cadeias resultantes. Fragmentos com quarenta resíduos (β A₁₋₄₀) consistem nas espécies mais numerosas, seguido por fragmentos compostos por quarenta e dois aminoácidos (β A₁₋₄₂), os quais são menos solúveis e apresentam uma maior propensão a processos de agregação [227,232]. Se não forem adequadamente degradados, ou ainda se existir um desequilíbrio entre sua produção e degradação, os peptídeos β A resultantes da clivagem amiloidogênica da PPA tendem a dobrar-se na forma de folhas- β e passam por processos sucessivos de agregação, partindo das formas monoméricas para gerar dímeros, trímeros, oligômeros e fibrilas, culminando na formação de placas senis extracelulares que se depositam no cérebro, levando a danos sinápticos progressivos que conduzem à neurodegeneração e à demência [206,233–236]. Além dos efeitos tóxicos nas sinapses, a presença de peptídeos β A pode comprometer o funcionamento mitocondrial, acarretando prejuízos no metabolismo energético que acabam por favorecer a morte celular [230].

3.1.2.2 Proteínas tau (pTau)

As pTau constituem estruturas proteicas nativamente não-dobradas e altamente hidrofílicas, que são membros da família de proteínas de associação a microtúbulos (MAPs) [237]. Os microtúbulos são polímeros de α - e β -tubulina que formam um dos principais

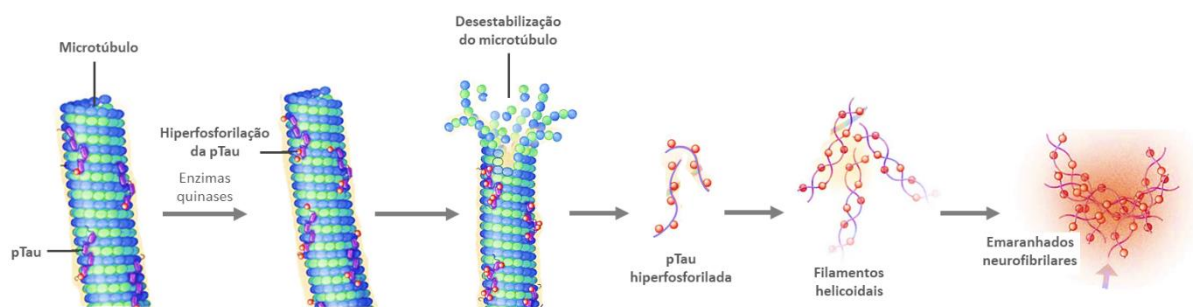
filamentos proteicos que constituem o citoesqueleto das células eucarióticas. Estes componentes, além de manter a estrutura e formato celular, estão envolvidos no processo de divisão celular e no transporte de materiais e vesículas no interior da célula, o qual é realizado por proteínas motoras (dineínas e quinesinas) que se movem na superfície dos mesmos [237,238].

A formação e estabilização dos microtúbulos são reguladas pelas MAPs, incluindo a pTau. Especificamente, a pTau é expressa predominantemente em neurônios, e apresenta localização axonal. Assim como outras MAPs, a pTau tem papel essencial na formação, estabilização e organização dos microtúbulos nos axônios. Além disso, atua no controle do transporte intracelular a partir da regulação da atividade motora das quinesinas e dineínas ao longo dos mesmos [239].

Após ser sintetizada, a pTau pode ser modificada estruturalmente por meio da inserção de diferentes grupos funcionais ou associação a outras proteínas. Entre tais modificações estruturais, podem ser citadas reações de fosforilação, acetilação, ubiquitinação, nitratação e glicação, entre outras, as quais geram diferentes proteoformas que participam da regulação da função da pTau como um todo nos neurônios [240,241]. De modo especial, a fosforilação da pTau controla a sua afinidade de ligação às moléculas de tubulina nos microtúbulos, o que é regulado por cascatas de sinalização envolvendo quinases e fosfatases (enzimas que catalisam a transferência e remoção de grupos fosfatos de seus substratos, respectivamente) [238,242]. Em condições normais, a pTau é fosforilada em múltiplos sítios (em cerca de trinta dos setenta e nove disponíveis para fosforilação) [243], o que é importante para a dinâmica de construção e desconstrução dos microtúbulos existente nos neurônios saudáveis [244]. Entretanto, processos de hiperfosforilação podem ocorrer durante eventos patológicos que originam as doenças neurodegenerativas conhecidas como tauopatias, entre as quais está a DA [240].

Ao contrário de sua forma normal, formas hiperfosforiladas da pTau são insolúveis, apresentam uma drástica diminuição na afinidade de ligação aos microtúbulos e associam-se entre si para formar estruturas filamentosas de conformação helicoidal que se redistribuem e culminam na formação de emaranhados neurofibrilares [236,238] (Figura 3.2), os quais se depositam no corpo celular dos neurônios afetados [238,242]. Neste sentido, a neurotoxicidade exercida por tais formas hiperfosforiladas da pTau relacionam-se a falhas da atuação adequada da mesma na estabilização dos microtúbulos [238], o que diretamente bloqueia o transporte vesicular de nutrientes e outras moléculas essenciais no interior dos neurônios, levando à neurodegeneração e morte celular [209].

Figura 3.2 – Efeito da hiperfosforilação na atividade da pTau e formação de emaranhados neurofibrilares.



Fonte: Modificado da referência [236].

Os efeitos tóxicos da pTau podem também estar relacionados com o aumento da produção e acúmulo de peptídeos β A no espaço extracelular, uma vez que a formação de emaranhados neurofibrilares de formas hiperfosforiladas da pTau é um dos eventos que integram a hipótese da cascata amiloide [226,245]. O desequilíbrio na produção e degradação dos peptídeos β A pode levar indiretamente a uma disfunção nas atividades de enzimas quinases e fosfatases, ocasionando fosforilações múltiplas nas moléculas de pTau e, consequentemente, a formação de seus respectivos agregados neurotóxicos [245].

3.1.3 Apolipoproteína E & DAz

A apolipoproteína E (ApoE) consiste em uma glicoproteína compreendida por 299 aminoácidos e com massa molecular ao redor de 34 kDa. É expressa em diferentes tecidos e órgãos, sobretudo no fígado e no cérebro [246]. As principais funções bioquímicas da ApoE estão associadas ao metabolismo de lipídeos (sobretudo do colesterol), sendo esta uma das principais lipoproteínas que regulam o transporte e distribuição dos mesmos em determinados tecidos ou células por meio de receptores de ApoE [246]. Tais funções são particularmente importantes para o sistema nervoso central e periférico, onde o transporte de colesterol pela ApoE é um fator crucial para uma conservação adequada da bainha de mielina e da membrana plasmática das células neuronais [247].

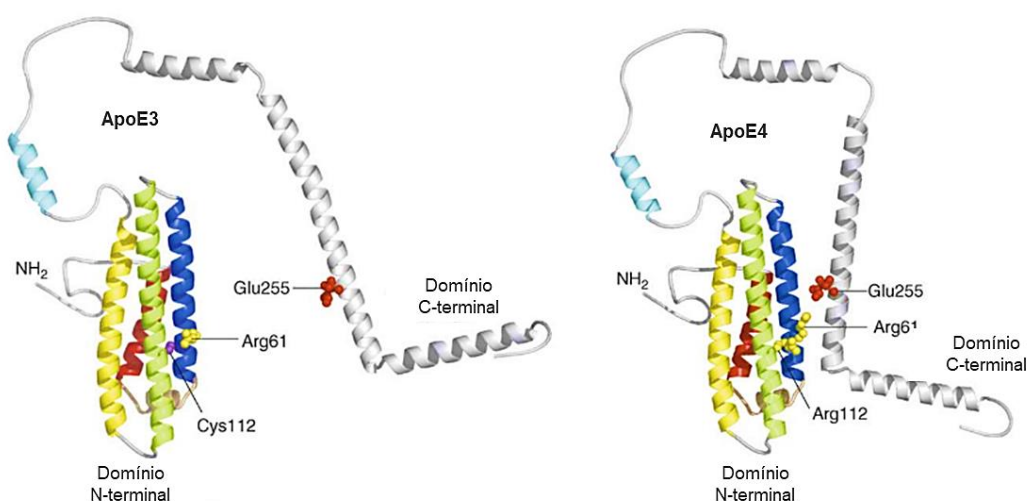
De modo geral, a ApoE (Figura 3.4) é caracterizada pela presença de dois domínios, sendo um deles N-terminal e o outro C-terminal, conectados por uma região de dobradiça. O domínio N-terminal (resíduos 1-167) é formado por um grupo de quatro α -hélices anfipáticas cujas cadeias laterais hidrofílicas voltam-se para o meio exterior, e contém uma região de ligação a receptores celulares de ApoE. Por outro lado, o domínio C-terminal (resíduos 206-299) apresenta três α -hélices que formam uma superfície hidrofóbica que contém uma região

de ligação a lipídeos. Ambos os domínios interagem entre si por meio de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas [248].

Em humanos, a ApoE é codificada pelo gene denominado *APOE*, o qual apresenta três alelos ($\epsilon 4$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 2$) que codificam as três principais isoformas da proteína: ApoE4, ApoE3 e ApoE2, as quais diferem entre si apenas nos resíduos de aminoácidos presentes nas posições 112 e 158 da cadeia polipeptídica, presentes no domínio N-terminal. Enquanto a ApoE3 contém, respectivamente, resíduos de Cys/Arg nestas posições, a ApoE2 apresenta Cys/Cys e a ApoE4, Arg/Arg [206,249]. O alelo *APOE* $\epsilon 3$ é o mais comum entre as populações, com uma prevalência que vai de 50-90%, enquanto que o *APOE* $\epsilon 4$ está presente em 5-35% e o *APOE* $\epsilon 2$ ocorre em apenas 1-5% dos indivíduos [246].

Como apresentado na Figura 3.3, as substituições mencionadas afetam marcadamente a estrutura das isoformas e consequentemente a suas propriedades de ligação a lipídeos [206]. Na ApoE4, os domínios N-terminal e C-terminal estão mais próximos entre si como resultado da interação eletrostática existente entre os resíduos de Arg61, carregado positivamente, e Glu255, carregado negativamente. Isto não ocorre na mesma extensão no caso da ApoE3 e da ApoE2, uma vez que uma conformação diferente é adotada nestes casos pela cadeia lateral do resíduo de Arg61 devido à presença da Cys112 (aminoácido polar, não carregado). Esta diferença conformacional torna a Arg61 menos acessível para o estabelecimento da interação eletrostática com o resíduo de Glu255 [249], resultando em um pronunciado afastamento entre ambos os domínios.

Figura 3.3 – Estruturas da (A) ApoE3 e da (B) ApoE4.



Fonte: Adaptado da referência [249].

O alelo APOE $\epsilon 4$ tem sido considerado como o fator genético de maior risco para a incidência da DALz, tanto precocemente quanto em pacientes idosos [206]. De fato, estudos demonstram que o risco de ocorrência da DALz aumenta em indivíduos com uma ($\epsilon 2/\epsilon 4$ e $\epsilon 3/\epsilon 4$) ou duas cópias do alelo $\epsilon 4$ ($\epsilon 4/\epsilon 4$) comparado ao genótipo $\epsilon 3/\epsilon 3$. Inversamente, o alelo $\epsilon 2$ aparenta ter um efeito protetor contra a doença mencionada, já que o risco de desenvolvimento de DALz em pacientes com o genótipo $\epsilon 2/\epsilon 2$ ou $\epsilon 2/\epsilon 3$ é menor do que para os carreadores do genótipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ [250]. Além da relação com a maior incidência da DALz, a presença do alelo $\epsilon 4$ está associada ao início da doença em idades mais precoces. Por exemplo, indivíduos homozigotos para o alelo $\epsilon 4$ ($\epsilon 4/\epsilon 4$) apresentam o início dos sintomas, em média, por volta dos 68 anos. Isto contrasta com a idade média de 76 e 84 anos para registro dos primeiros sinais clínicos da doença em indivíduos heterozigotos ($\epsilon 4/\epsilon 3$ ou $\epsilon 4/\epsilon 2$) e não carreadores do $\epsilon 4$, respectivamente [206].

O principal motivo para a maior ocorrência da DALz em portadores do alelo $\epsilon 4$ está ligada ao fato de que a ApoE4 pode interferir no metabolismo e agregação dos peptídeos βA , de modo a favorecer seu acúmulo na forma de placas senis extracelulares cerebrais [206,251,252]. De fato, diversos trabalhos têm reportado uma deposição mais expressiva de peptídeos βA no cérebro de portadores do alelo $\epsilon 4$ comparado a indivíduos não-portadores [252–255]. Estas observações confirmam que a ApoE4 aumenta o risco de incidência da DALz, acelerando a agregação e deposição dos referidos peptídeos no tecido cerebral [252]. Estudos têm demonstrado que o acúmulo de tais agregados na presença da ApoE4 é resultado da sua capacidade de associação direta a fragmentos βA para formar complexos proteicos que podem afetar a degradação destes últimos, facilitando a formação dos depósitos neurotóxicos [251,252,256–258]. Esta informação é também suportada pelo fato de que a ApoE4 é encontrada no interior das placas senis cerebrais de pacientes com DALz, evidenciando sua co-deposição juntamente com os peptídeos βA para a formação de agregados que levam à progressão da doença [206,246].

Embora registros da influência da ApoE no processo de fosforilação da pTau não sejam tão frequentes, alguns trabalhos relatam que a ApoE4 pode favorecer a ocorrência do processo [259–261]. A ApoE4 pode afetar a fosforilação da pTau tanto por associação direta à esta, ou via mecanismos envolvendo receptores celulares de ApoE e ativação de enzimas quinases [262]. Deste modo, esta isoforma também pode indiretamente favorecer a formação de emaranhados neurofibrilares que se depositam no interior das células neuronais, levando progressivamente à neurodegeneração. Wadhvani e colaboradores (2019) [259] observaram que culturas de neurônios expressando a ApoE4 apresentaram um aumento na fosforilação da

pTau comparado a culturas expressando ApoE3, sugerindo que a expressão da ApoE4 pode predispor células neuronais a efeitos tóxicos e acelerar os processos neurodegenerativos. Em outro estudo, Shi e colaboradores (2017) [261] demonstraram que camundongos portadores do alelo $\epsilon 4$ apresentaram níveis cerebrais significativamente maiores de pTau fosforilada e uma maior atrofia cerebral do que os animais portadores do alelo $\epsilon 3$ ou $\epsilon 2$. Farfel e colaboradores (2016) [260] interessante observaram uma maior associação da ApoE4 com agregados de pTau na presença de βA comparado à ausência do peptídeo, em análises de tecidos cerebrais *post-mortem* de indivíduos com DAz. Isto sugere que os efeitos da ApoE4 no processo de agregação da pTau pode ser também dependente de fragmentos proteicos βA .

3.1.3.1 ApoE4 & SIRT1

As sirtuínas consistem em uma família de enzimas desacetilases dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) altamente conservadas entre organismos procarióticos e humanos [263]. Sua ocorrência foi reportada pela primeira vez em leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, onde a sirtuína Sir2 (*silent information regulator 2*) mostrou possuir atividades envolvidas no silenciamento de genes [264]. A descoberta posterior de que a Sir2 está envolvida no aumento do tempo de vida dos micro-organismos mencionados [265] fez com que esta classe de proteínas recebesse crescente atenção.

Os mamíferos codificam sete diferentes sirtuínas (Sirt1-7), as quais contêm um domínio catalítico conservado que se liga a NAD^+ , e diferem em seus domínios N- e C-terminais. Apesar de inicialmente terem sido classificadas como enzimas desacetilases [266], as sirtuínas são hoje reconhecidas por terem muitos outros modos de atividade enzimática (no caso das Sirt4-7) [267,268] e por assim estarem envolvidas na regulação de diversos processos, entre os quais pode-se mencionar a expressão gênica (reguladores de transcrição), metabolismo e ciclo celular, reparo de DNA, resposta imune e neuroproteção [269,270]. É importante mencionar também que, considerando que as reações catalisadas pelas sirtuínas requerem NAD^+ como co-substrato, a atividade das mesmas é diretamente relacionada ao estado energético da célula [263].

O membro mais estudado da família das sirtuínas é a Sirt1 (Figura 3.4A), que catalisa a desacetilação de histonas e de uma variedade de substratos no núcleo e no citoplasma [268,271], e está envolvida em diversas atividades celulares, incluindo supressão de inflamação, aumento da plasticidade neuronal e proteção contra a neurodegeneração [263,271,272]. É expressa em todos os tecidos e células, porém seus níveis são particularmente

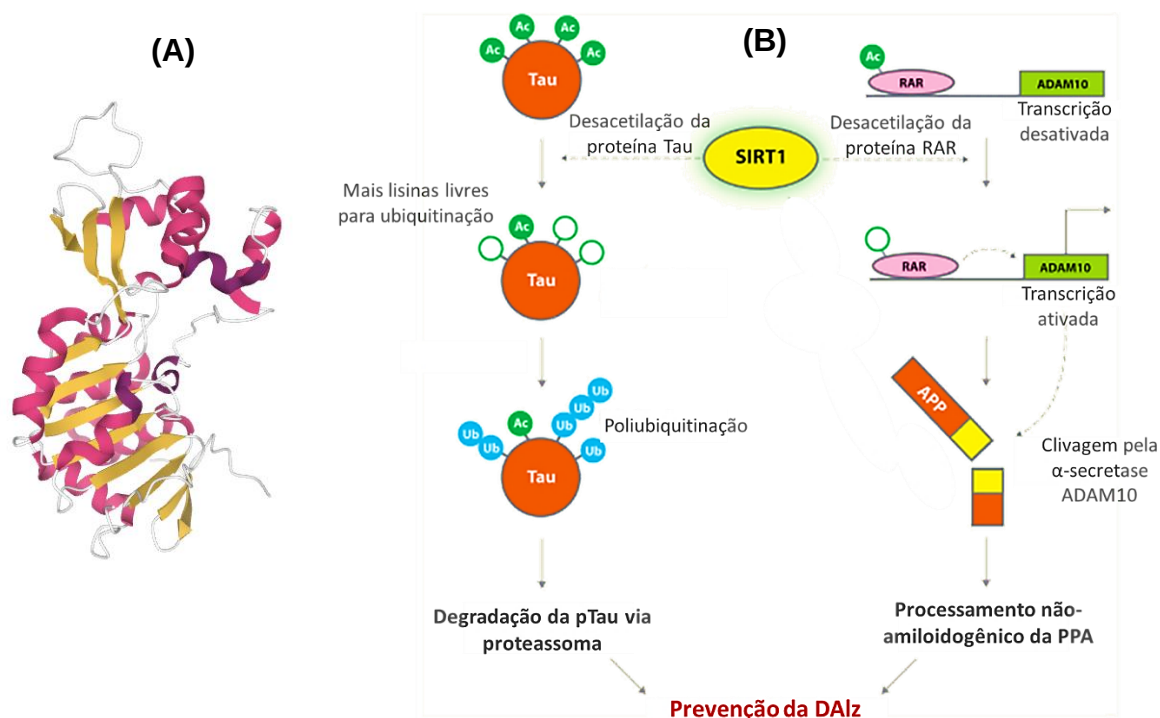
elevados no cérebro, o que sugere sua grande importância para o funcionamento neuronal [273]. De fato, diversos trabalhos têm relatado os efeitos neuroprotetores exercidos pela Sirt1 [274,275], os quais baseiam-se principalmente na prevenção da formação de placas senis de peptídeos β A e de emaranhados neurofibrilares da pTau.

A redução de peptídeos β A é resultado do aumento da expressão da α -secretase ADAM10 em neurônios mediado pela Sirt1, a qual inicialmente ativa o receptor de ácido retinóico β (RAR β) por meio de reações catalíticas de desacetilação. Uma vez ativado, o RAR β ativa a transcrição da ADAM10, o que conduz, portanto, à maior ativação da rota não-amiloidogênica de clivagem da PPA. Neste sentido, uma diminuição na produção de peptídeos β A é observada, minimizando seus efeitos neurotóxicos [273,274,276] (Figura 3.4B).

O segundo efeito neuroprotetor exercido pela Sirt1 está relacionado ao decréscimo nos níveis de formas acetiladas e hiperfosforiladas da pTau, o que atenua o seu acúmulo em células neuronais. Estudos desenvolvidos por Julien e colaboradores (2009) [277] demonstraram que os níveis de Sirt1 correlacionam-se negativamente com a quantidade de emaranhados neurofibrilares no cérebro de pacientes com DAz, e esta associação sugere um possível papel patológico da deficiência desta proteína em processos de agregação da pTau que contribuem para a neurodegeneração. Em outro estudo, Corpas e colaboradores (2017) [278] relataram um aumento nos níveis de formas hiperfosforiladas da pTau concomitante à elevação dos níveis das formas acetiladas da mesma em culturas de neurônios, sugerindo que reações de acetilação precedem processos de fosforilação da pTau. Neste sentido, a atividade desacetilase da Sirt1 pode ajudar a regular indiretamente os níveis de tais formas hiperfosforiladas da pTau, e, consequentemente, pode frear processos posteriores de agregação proteica [279,280].

A Sirt1 pode ainda influenciar a proteólise da pTau por meio do complexo enzimático proteassoma, o qual catalisa a destruição de proteínas danificadas a partir do reconhecimento da presença de cadeias de ubiquitina em série na superfície das mesmas [281]. Uma vez que tanto a acetilação quanto a ubiquitinação ocorrem em resíduos de lisina, pode-se afirmar que a ausência da Sirt1 pode elevar o nível de acetilação na pTau, e, desta forma, prejudicar sua marcação com moléculas de ubiquitina e então o processo de degradação via proteassoma. Assim, a atividade enzimática da Sirt1 pode acarretar um aumento no número de resíduos de lisina disponíveis para reações de ubiquitinação, e indiretamente viabilizar a destruição de formas tóxicas da pTau, restringindo sua acúmulo nos neurônios [271,279,282] (Figura 3.4B).

Figura 3.4 – (A) Estrutura da Sirt1. (B) Representação dos mecanismos neuroprotetores da Sirt1.



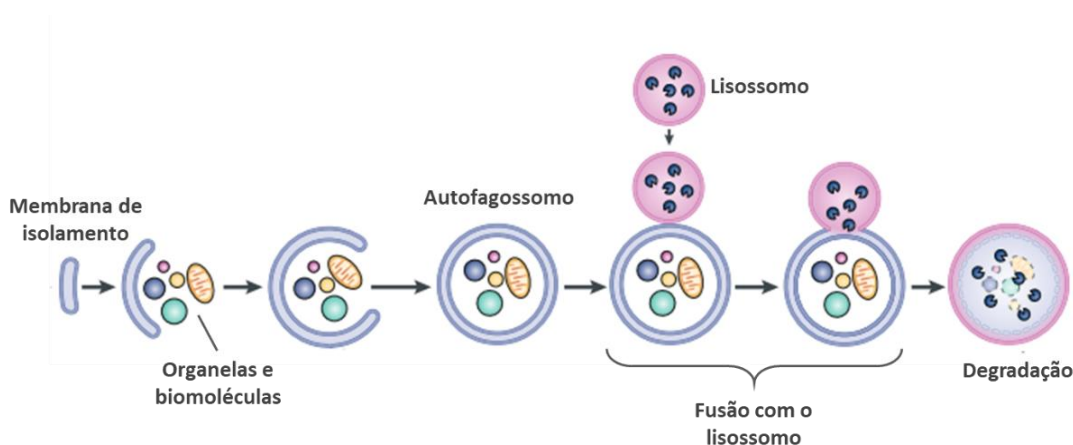
Fonte: (A) Referência [283]. (B) Adaptado da referência [271].

Trabalhos recentes têm destacado que a ApoE4 pode indiretamente afetar a atividade enzimática da Sirt1, e, consequentemente, os seus efeitos neuroprotetores. Theendakara e colaboradores (2013) demonstraram [284], por exemplo, que a expressão da ApoE4 é associada a uma redução significativa nos níveis de Sirt1, tanto em culturas de células neuronais quanto em tecido cerebral *post-mortem* de indivíduos com DALz. Em estudos posteriores, os mesmos autores demonstraram que a redução nos níveis de Sirt1 na presença de ApoE4 devem-se à existência de interações fortes entre esta última e a sequência de DNA promotora para a transcrição do gene que expressa a Sirt1 [285]. Este promotor é composto por ~250 pares de base e contém o fragmento 5'CAGCCTCCGCCCGCCACGTGACCCGTAGTG3', que revelou interagir com a ApoE4 com elevada afinidade pelas técnicas de SPR e imunoprecipitação da cromatina (ChIP) [285]. Deste modo, a ApoE4 mostrou atuar como repressor da expressão de Sirt1. Obviamente, a inibição da biossíntese desta última acarreta falhas consideráveis nos mecanismos celulares neuroprotetores anteriormente descritos, o que pode contribuir diretamente para a neurodegeneração e desenvolvimento da DALz. Neste sentido, tais estudos ajudam a elucidar possíveis mecanismos que justificam a maior probabilidade de desenvolvimento da DALz em indivíduos portadores do alelo APOE ε4.

3.1.3.2 ApoE4 & CLEAR

Além da comprovada influência exercida pela ApoE4 em mecanismos celulares neuroprotetores, estudos recentes têm atribuído que a mesma pode influenciar mecanismos de autofagia celular pelos quais a degradação de elementos proteicos neurotóxicos deveria ocorrer [286,287]. De maneira geral, pode-se definir autofagia celular como um conjunto de mecanismos intracelulares dedicados à degradação e reciclagem de constituintes danificados ou que não são mais úteis à célula, como proteínas e organelas [288]. O principal mecanismo autofágico (macroautofagia) consiste no encerramento das estruturas e biomoléculas a serem desintegradas no interior de vesículas esféricas denominadas autofagossomos, que subsequentemente fundem-se com lisossomos (os quais contêm um conjunto de enzimas hidrolases em seu interior) para início do processo de degradação [289,290] (Figura 3.5). O processo resulta na produção de moléculas monoméricas, como aminoácidos, os quais retornam ao citoplasma para serem reutilizados [291].

Figura 3.5 – Representação do processo de autofagia (macroautofagia).



Fonte: Adaptado da referência [290].

Deste modo, processos de autofagia celular são altamente benéficos para a célula, uma vez que, além de remover organelas e outras biomoléculas que não são mais úteis à mesma, acaba por ser uma fonte contínua de substratos necessários a inúmeros processos celulares essenciais, como biossíntese proteica e geração de energia [292]. No contexto da DAz, a autofagia desempenha um papel de suma importância no sentido de prevenir a formação de agregados neurotóxicos que culminam em processos neurodegenerativos [289]. Esta hipótese é confirmada pelo fato de que organelas autofágicas preenchidas com substratos não digeridos

são encontradas abundantemente no cérebro de indivíduos com DAz [293,294]. Além disso, estudos recentes relatam uma má-formação de autofagossomos em neurônios de pacientes também com DAz [295,296], sugerindo que a autofagia nas células neuronais é realmente afetada durante o progresso da doença.

Recentemente, Parcon e colaboradores (2018) [286] elucidaram um possível mecanismo que relaciona a maior probabilidade de incidência da DAz em portadores do alelo APOE $\epsilon 4$ com mecanismos de autofagia celular. A partir de estudos *in vitro* (imunofluorescência, ensaios *pull-down* e de mobilidade eletroforética, entre outros) em tecido cerebral e culturas celulares e estudos *in silico* por *docking* molecular, os autores investigaram a hipótese de que a ApoE4 poderia afetar processos autofágicos a nível transcricional, no sentido de interferir na expressão de três proteínas essenciais ao funcionamento dos mesmos: p62, LC3B e LAMP2 [286]. A síntese de tais biomoléculas é ativada a partir da ligação do fator de transcrição EB (TFEB) às suas respectivas sequências de DNA promotoras [297]. O TFEB liga-se a sítios específicos que contém o fragmento 5'GTCACGTGAC3', o qual localiza-se no interior de uma sequência de 200 pares de bases anteriormente ao sítio de início de transcrição, e pode ocorrer tanto como uma sequência única quanto como cópias múltiplas ligadas em série [298]. Devido à sua associação com a expressão de proteínas necessárias à biogênese de lisossomos e ao processo de autofagia em geral, a sequência mencionada foi denominada Elemento de Expressão e Regulação Lisossomal Coordenada (CLEAR) [298].

Em seu trabalho, Parcon e colaboradores (2018) [286] concluíram que interações fortes e específicas podem ocorrer entre a sequência CLEAR e a ApoE4, de modo a estabelecer uma competição entre esta última e o TFEB para ligação ao fragmento de DNA mencionado. Uma vez ligada à sequência CLEAR, a ApoE4 pode suprimir parcialmente a expressão das proteínas p62, LC3B e LAMP2, e, desta maneira, comprometer a degradação autofágica de peptídeos βA e de formas hiperfosforiladas da pTau no ambiente celular. De fato, uma redução nos níveis de RNA mensageiro (mRNA) resultantes da transcrição dos genes que codificam as proteínas mencionadas foi observada no cérebro de carreadores do genótipo APOE $\epsilon 4/\epsilon 4$ comparado a carreadores do genótipo APOE $\epsilon 3/\epsilon 3$ [286]. Neste sentido, a ApoE4 mostrou atuar como um fator de transcrição, podendo causar efeitos repressivos à expressão de genes que codificam proteínas necessárias ao processo de autofagia, e isto pode estar diretamente associado ao acúmulo cerebral de elementos proteicos tóxicos característicos da DAz.

No que diz respeito à investigação eletroquímica das interações das sequências SIRT1 e CLEAR com as diferentes isoformas de ApoE, apenas um trabalho foi reportado até o momento [299], o qual corresponde aos resultados apresentados no presente capítulo.

Oligonucleotídeos SIRT1 e CLEAR funcionalizados na extremidade 5' com uma cadeia saturada de seis carbonos contendo um grupo tiol foram co-imobilizados com MCH na forma de SAM mistas em AuEs. Os eletrodos modificados foram caracterizados por técnicas como VPD, VC, EIE e cronocoulometria, enquanto que as interações entre as sequências imobilizadas e as isoformas ApoE4, ApoE3 e ApoE2 foram avaliadas por meio de medidas de VPD e EIE.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a interação dos oligonucleotídeos SIRT1 e CLEAR com diferentes isoformas de ApoE (ApoE2, ApoE3 e ApoE4) por meio das técnicas de voltametria de pulso diferencial (VPD) e EIE, a partir da imobilização das referidas sequências em eletrodos de ouro (AuE).

3.2.2 Objetivos Específicos

- Imobilizar as sequências SIRT1 e CLEAR sobre AuEs na forma de monocamadas auto-organizadas (SAM) mistas com MCH;
- Monitorar o processo de modificação dos AuE com os oligonucleotídeos a partir da realização de medidas de VC e EIE;
- Estimar o número de oligonucleotídeos SIRT1 e CLEAR imobilizados sobre os AuE por meio de medidas de cronocoulometria;
- Determinar a natureza do transporte de massa para o processo redox dos íons $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ sobre os AuE modificados com as sequências estudadas por meio de VC;
- Avaliar a interação das simples- e duplas-fitas das sequências SIRT1 e CLEAR imobilizadas sobre os AuEs frente à isoforma ApoE4 por meio de experimentos de VPD e EIE;
- Avaliar a interação das duplas-fitas (df) das sequências estudadas com as isoformas ApoE2 e ApoE3 por meio de medidas de VPD e EIE para comparação aos resultados obtidos na presença da ApoE4.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Reagentes e Soluções

Os oligonucleotídeos empregados neste trabalho foram sintetizados e adquiridos da empresa BioBasic, Inc. (Markham, ON, Canadá). As sequências CLEAR e SIRT1 foram constituídas por 18 e 30 pares de bases (pb), respectivamente, de acordo com estudos previamente reportados [285,286], e ambas foram funcionalizadas na extremidade 5' com um grupo tiol ligado a uma cadeia saturada de seis carbonos. Sequências complementares e embaralhadas (*scrambled*) também foram utilizadas, assim como apresentado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Sequências dos oligonucleotídeos empregados neste trabalho.

Oligonucleotídeo	Sequência
CLEAR (simples-fita)	5'-HS-(CH ₂) ₆ -GTA GGT CAC GTG ACC GGG-3'
CLEAR complementar	5'-CCC GGT CAC GTG ACC TAC-3'
CLEAR <i>scrambled</i> (simples-fita)	5'-HS-(CH ₂) ₆ -GTA GGT CTG CAG ACC GGG-3'
CLEAR <i>scrambled</i> complementar	5'-CCC GGT CTG CAG ACC TAC-3'
SIRT1 (simples-fita)	5'-HS-(CH ₂) ₆ -CAG CCT CCG CCC GCC ACG TGA CCC GTA GTG-3'
SIRT1 complementar	5'-CAC TAC GGG TCA CGT GGC GGG CGG AGG CTG-3'
SIRT1 <i>scrambled</i> (simples-fita)	5'-HS-(CH ₂) ₆ -CCC TGC GCT GTG CCG CCA AAC CTG ACG CCG-3'
SIRT1 <i>scrambled</i> complementar	5'-CGG CGT CAG GTT TGG CGG CAC AGC GCA GGG-3'

As isoformas de ApoE humana recombinante (ApoE4, ApoE3 e ApoE2) foram adquiridas da empresa Peptotech (VWR) (Rocky Hill, NJ, EUA). Os sais dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄), monohidrogenofosfato de sódio (Na₂HPO₄), cloreto de potássio (KCl) e cloreto de hexaaminrutênio(III) ([Ru(NH₃)₆]Cl₃) e o tiol 6-mercaptop-1-hexanol (MCH) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canadá). O cloreto de magnésio hexahidratado (MgCl₂.6H₂O) foi obtido da empresa BioBasic, Inc. (Markham, ON, Canadá), enquanto que o cloreto de sódio (NaCl) e o tris(hidroximetil)aminometano (Tris) foram adquiridos da empresa BioShop, Inc. (Burlington, ON, Canadá).

Todas as soluções foram preparadas em água ultra-pura (18.2 MΩ, obtida a partir de sistema de purificação Cascada LS) previamente esterilizada. O tampão PBS foi preparado a

partir dos sais NaCl ($0,14 \text{ mol L}^{-1}$), Na_2HPO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($0,0018 \text{ mol L}^{-1}$) e KCl ($0,0027 \text{ mol L}^{-1}$), e o pH foi ajustado para 7,4 com soluções de NaOH e HCl, ambas a $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. As soluções dos oligonucleotídeos CLEAR e SIRT1 foram preparadas no tampão de imobilização, o qual foi constituído por tampão PBS pH 7,4, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (50 mmol L^{-1}) e MCH ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Para o preparo das soluções das sequências complementares empregou-se o tampão de hibridização, o qual foi composto por tampão PBS e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (50 mmol L^{-1}). De modo particular, os tampões de imobilização e hibridização foram preparados em água ultra-pura estéril e livre de nucleases (Thermo Fisher Scientific, Mississauga, ON, Canadá).

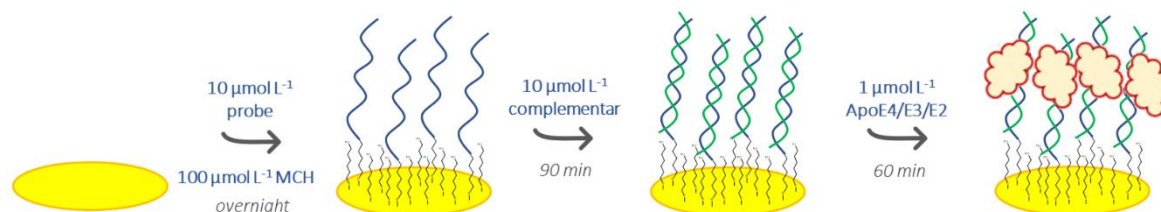
3.3.2 Modificação dos Eletrodos de Ouro

Primeiramente, a superfície dos AuEs (área geométrica = $0,24 \text{ cm}^2$) foi polida mecanicamente empregando-se suspensões de Al_2O_3 em granulometrias $1,0 \mu\text{m}$ e $0,3 \mu\text{m}$, seguido por lavagem e banho ultrassônico em água ultra-pura por cinco minutos. A seguir, os eletrodos foram submetidos a cinquenta varreduras voltamétricas consecutivas na faixa de 0,0 a $-1,5 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl) a 500 mV s^{-1} em meio de NaOH, e então ciclados novamente por cinquenta vezes na faixa de 0,0 a $+1,5 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl) em meio de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a 50 mV s^{-1} [300]. Os AuEs foram então lavados e secos sob fluxo de N_2 .

Os AuEs limpos foram modificados segundo as etapas representadas na Figura 3.6. A modificação com as simples-fitas das sequências CLEAR ou SIRT1 deu-se por meio de incubação em $6 \mu\text{L}$ de solução $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada oligonucleotídeo (na presença de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MCH) por ao menos 18 horas em uma câmara úmida a 4°C . Os AuEs modificados com as simples-fitas (sf-CLEAR/MCH/AuE ou sf-SIRT1/MCH/AuE) foram então lavados em tampão PBS, e a hibridização com as fitas complementares foi realizada por meio de incubação em $6 \mu\text{L}$ de solução $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ das mesmas por 90 minutos a 20°C (preparadas no tampão de hibridização). Os eletrodos contendo as duplas-fitas (df-CLEAR/MCH/AuE ou df-SIRT1/MCH/AuE) foram lavados em tampão PBS e secos sob fluxo de N_2 .

Os estudos de interação dos AuEs modificados (simples-fita ou dupla-fita) foram realizados a partir da incubação dos mesmos em soluções $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ApoE4, ApoE3 ou ApoE2 por 60 minutos a 20°C , seguido por lavagem em tampão PBS e realização de medidas de VPD e EIE.

Figura 3.6 – Representação esquemática do processo de modificação dos AuEs com as simples- e duplas-fitas dos oligonucleotídeos CLEAR e SIRT1, seguido por interação com as isoformas de ApoE.



Fonte: O autor.

3.3.3 Medidas Eletroquímicas

Medidas de VPD, EIE, VC e cronocoulometria foram realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato μ Autolab PGSTAT 128N, controlado pelo *software* NOVA 2.1. Em todos os casos, empregou-se uma célula eletroquímica contendo um fio espiral de platina, um eletrodo de Ag/AgCl e os AuEs modificados com os oligonucleotídeos como eletrodo auxiliar, de referência e de trabalho, respectivamente. Como eletrólito suporte, empregou-se tampão PBS (pH 7.4) contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, exceto nos experimentos de cronocoulometria, onde o tampão Tris 10 mmol L^{-1} (pH 7.4) foi utilizado. Todas as medidas foram realizadas na presença de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ do marcador redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$.

Os experimentos de VC foram realizados no intervalo de +0,2 V a -0,4 V (vs. Ag/AgCl) a uma velocidade de varredura de potencial igual a 50 mV s^{-1} . As medidas de VPD, por sua vez, foram realizadas na faixa de +0,2 V a -0,5 V (vs. Ag/AgCl) empregando-se uma amplitude de pulso de 50 mV e um tempo de modulação de 50 ms, com intervalo de 500 ms e velocidade de varredura igual a 10 mV s^{-1} . Os experimentos de EIE foram executados a partir da aplicação constante de um potencial igual a -0,20 V (vs. Ag/AgCl) ao qual uma onda senoidal de 10 mV de amplitude foi aplicada, no intervalo de frequências de 10 kHz a 100 mHz. Para as medidas de cronocoulometria, aplicou-se um potencial de +0,1 V por 500 ms sobre o eletrodo de trabalho, seguido por aplicação de -0,40 V (vs. Ag/AgCl) por 500 ms adicionais (duração total = 1 s). Em todos os casos, o eletrólito suporte foi desaerado com N_2 por ao menos 10 minutos antes da realização das medidas eletroquímicas.

3.3.4 Análise Estatística dos Dados Obtidos

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. A fim de se avaliar a existência de diferenças estatisticamente

significativas entre as respostas obtidas por VPD e EIE após os estudos de interação dos oligonucleotídeos CLEAR e SIRT1 com as diferentes isoformas de ApoE, aplicou-se o teste de Tukey a um nível de confiança igual a 95% por meio do emprego do *software* GraphPad Prism 5.0.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Caracterização Eletroquímica dos Eletrodos Modificados

3.4.1.1 Estudo das etapas de modificação dos AuE

As alterações nas propriedades eletroquímicas interfaciais dos AuEs resultantes da formação das SAMs mistas das sequências SIRT1 e CLEAR com MCH, e do evento de hibridização com as sequências complementares foram monitoradas a partir de medidas de VPD e EIE na presença do marcador redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$. Este complexo foi selecionado para os estudos considerando seu comportamento redox bem definido e o fato de ser positivamente carregado, permitindo o estabelecimento de interações eletrostáticas com os grupos fosfatos dos oligonucleotídeos imobilizados sobre os AuEs, e, portanto, a maximização dos sinais voltamétricos observados [69].

Pode-se verificar na Figura 3.7 a presença de um pico catódico bem definido na faixa de -0,20 V a -0,15 V (vs. Ag/AgCl) para cada etapa de modificação, o qual corresponde ao processo de redução dos íons $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ a $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$. Os diagramas de Nyquist, por sua vez, apresentaram um semicírculo na região de altas frequências, referente ao processo de transferência de carga na interface eletrodo/solução, e uma linha com inclinação de aproximadamente 45° referente ao processo de difusão das espécies eletroativas em solução [186].

Um significativo decréscimo nas correntes de pico catódico (I_{pc}) e aumento no valor de R_{ct} foram observados após a modificação do AuE com a SAM de MCH (MCH/AuE) (Figura 3.8 e Tabela 3.2). Este comportamento é devido ao efeito isolante causado pela imobilização das moléculas de tiol na superfície do eletrodo, a qual ocorreu por meio do estabelecimento de ligações covalentes Au-S [301,302]. A formação da SAM de MCH bloqueia de maneira parcial o acesso dos íons $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ à superfície eletródica e dificulta, portanto, o processo de transferência eletrônica na superfície dos eletrodos. Como consequência deste fato, menores correntes de pico e uma maior R_{ct} são observadas.

Por outro lado, a co-imobilização de MCH e dos oligonucleotídeos CLEAR ou SIRT1, na forma de SAMs mistas (sf-CLEAR/MCH/AuE e sf-SIRT1/MCH/AuE), levou à obtenção de maiores valores de I_{pc} e menores valores de R_{ct} em comparação às respostas observadas para a SAM de MCH (Figura 3.8 e Tabela 3.2). As variações registradas são consequência da presença das sequências de DNA imobilizadas, as quais facilitaram a aproximação dos íons $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ por meio do estabelecimento de interações eletrostáticas com seus grupos fosfatos, e consequentemente o processo de transferência eletrônica [303,304]. Portanto, o aumento na concentração das espécies eletroativas próximas à superfície eletródica levou a uma maior intensidade de corrente de pico e a uma menor R_{ct} .

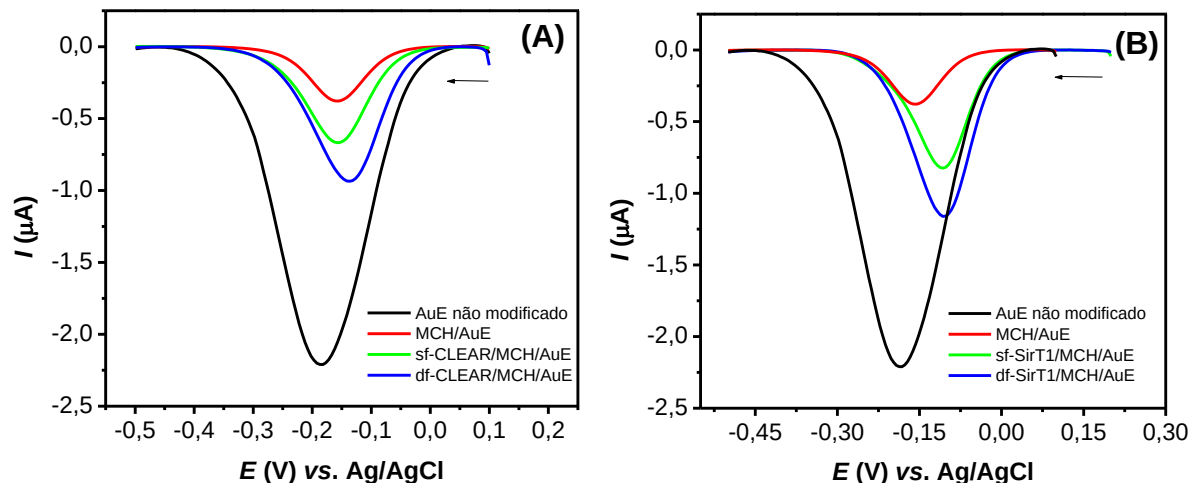
Após o evento de hibridização, novos aumentos em I_{pc} e uma nova diminuição na R_{ct} foram observados (Figura 3.7 e Tabela 3.2), de modo que este comportamento possivelmente é um indicativo da formação das duplas-fitas dos oligonucleotídeos estudados na superfície do AuE (ds-CLEAR/MCH/AuE e ds-SIRT1/MCH/AuE). Considerando que uma maior quantidade de grupos fosfatos passa a estar, direta ou indiretamente, ligada ao AuE após a hibridização, pode-se afirmar que um maior número de sítios de ligação negativamente carregados passa a estar disponível para a aproximação dos íons $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$. Um comportamento semelhante foi descrito por García-Mendiola e colaboradores [305], onde o valor de I_{pc} para a redução de íons $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ por DPV aumentou após o evento de hibridização em superfícies de ouro. Além do acréscimo na intensidade de corrente, um deslocamento no potencial de pico catódico para menores valores pode ser observado após a ligação das simples-fitas e formação das duplas-fitas sobre o AuE. Deste modo, confirma-se que o processo de transferência de carga do marcador redox $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ ocorre mais facilmente na presença dos oligonucleotídeos imobilizados.

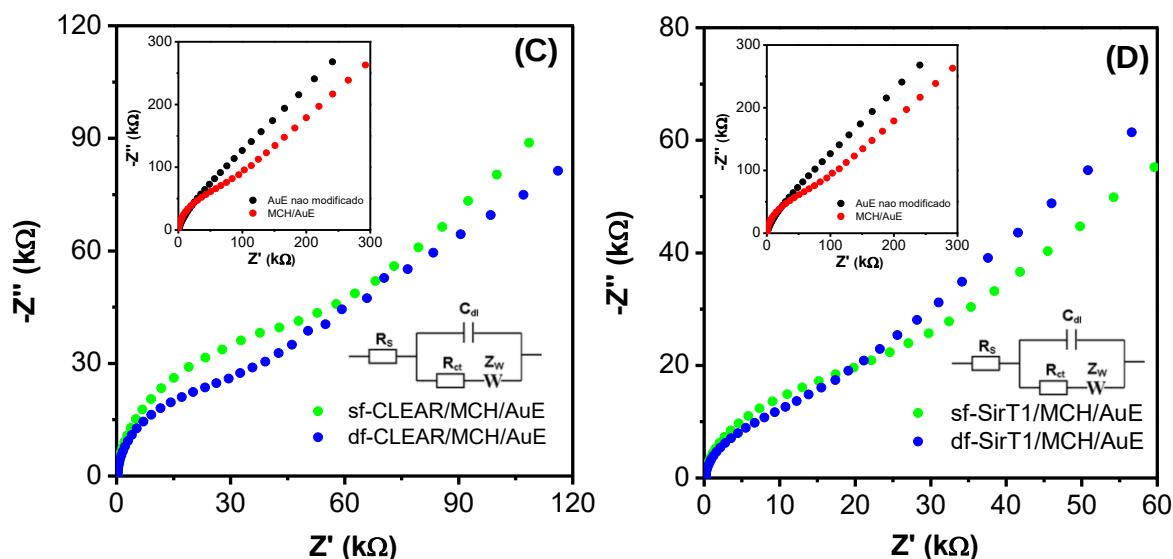
Pode-se observar ainda na Figura 3.7 e Tabela 3.2 que o eletrodo modificado com a sequência SIRT1 mostrou maiores valores de I_{pc} e menores valores de R_{ct} para as etapas de ligação ao AuE e hibridização em comparação às etapas análogas para a sequência CLEAR. Esta tendência pode ser justificada considerando-se o número de pares de bases (pb) que compõe cada oligonucleotídeo. Enquanto a sequência SIRT1 apresenta 30 pb, o fragmento CLEAR possui apenas 18 pb. Neste sentido, é de se esperar que uma maior quantidade de espécies eletroativas irá interagir com os oligonucleotídeos SIRT1 do que no caso da sequência CLEAR, o que possivelmente levou a picos de corrente mais intensos e menores valores de R_{ct} .

Verifica-se na Tabela 3.2 que os valores de capacitância da dupla-camada elétrica (C_{dl}) não variaram de modo significativo a partir da modificação dos AuE com os oligonucleotídeos estudados. Segundo trabalhos previamente reportados na literatura, incrementos no valor de C_{dl}

podem ser atribuídos a um aumento na área interfacial entre a superfície do eletrodo e o eletrólito suporte, como resultado do processo de modificação química do material condutor em que se baseia o dispositivo em desenvolvimento [306,307]. Neste sentido, pode-se afirmar que a imobilização das sequências de DNA sobre os AuE na forma de SAMs mistas com MCH, e também o evento de hibridização após a ligação das fitas complementares, não proporcionaram aumentos na área eletroativa dos eletrodos utilizados. Portanto, os maiores valores de corrente e os menores valores de R_{ct} registrados após a imobilização dos oligonucleotídeos e após o processo de hibridização, em comparação às respostas obtidas para a SAM de MCH, parecem estar relacionados principalmente à existência de interações eletrostáticas entre os íons $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ e os grupos fosfatos das sequências estudadas. Como mencionado anteriormente, a existência de tais interações facilitou o acesso de um maior número de espécies eletroativas à superfície do AuE, resultando em picos de corrente mais intensos e menores valores de R_{ct} .

Figura 3.7 – Voltamogramas de pulso diferencial (A e B) e diagramas de Nyquist (C e D) obtidos a cada etapa de modificação para o df-CLEAR/MCH/AuE (A e C) e o df-SIRT1/MCH/AuE (B e D) (eletrólito suporte: tampão PBS (pH 7.4) contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$).





Fonte: O autor.

Tabela 3.2 – Valores de I_{pc} e parâmetros eletroquímicos resultantes do ajuste dos dados de EIE ao circuito de Randles ($n = 3$), a cada etapa de modificação do AuE com os oligonucleotídeos SIRT1 e CLEAR.

Modificação	$-I_{pc}$ (μA)	R_s (Ω)	R_{ct} ($k\Omega$)	C_{dl} (nF)
AuE não modificado	$2,39 \pm 0,04$	$164,0 \pm 1,8$	—	—
MCH/AuE	$0,37 \pm 0,01$	$161,1 \pm 9,5$	$60,6 \pm 5,4$	$163,3 \pm 6,4$
sf-SIRT1/MCH/AuE	$0,83 \pm 0,02$	$163,0 \pm 7,2$	$13,4 \pm 1,9$	$166,4 \pm 2,5$
df-SIRT1/MCH/AuE	$1,12 \pm 0,04$	$158,3 \pm 3,2$	$8,7 \pm 3,3$	$159,7 \pm 2,3$
sf-CLEAR/MCH/AuE	$0,64 \pm 0,03$	$160,9 \pm 9,4$	$37,3 \pm 3,6$	$157,0 \pm 4,6$
df-CLEAR/MCH/AuE	$0,98 \pm 0,06$	$160,3 \pm 5,4$	$26,4 \pm 2,1$	$165,6 \pm 1,5$

3.4.1.2 Estimativa do número de oligonucleotídeos imobilizados

A fim de se estimar o grau de recobrimento dos AuE em termos do número de moléculas de DNA imobilizadas na SAM com MCH, medidas de cronocoulometria foram realizadas com o sf-CLEAR/MCH/AuE e com o sf-SIRT1/MCH/AuE em meio de tampão Tris 10 mmol L^{-1} (pH 7,4) contendo $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ do marcador redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, de acordo com o procedimento desenvolvido por Steel e colaboradores [304]. Neste método, assume-se que as sequências de DNA ligadas a uma superfície eletródica de Au podem ser quantificadas considerando-se a quantidade de íons $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ eletrostaticamente ligados à mesma [304]. Assim, quando um eletrodo modificado com DNA é exposto à presença de cátions $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ em uma solução de baixa força iônica (como o tampão Tris), inicia-se um processo de troca entre tais espécies eletroativas e os cátions originalmente associados

(possivelmente íons Na^+) aos grupos fosfatos das cadeias de DNA [304,308]. Sabendo-se que a constante de associação entre os cátions e os oligonucleotídeos aumenta proporcionalmente com a carga dos mesmos [309], pode-se assumir que tais cátions trivalentes permanecerão eletrostaticamente associados às sequências.

O excesso superficial de cátions $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ associados via interações eletrostáticas às sequências de DNA imobilizadas pode ser determinado por meio de cronocoulometria e empregando-se a forma integrada da equação de Cottrel, a qual expressa a carga total Q em função do tempo t como uma soma de três componentes: (i) a carga resultante do processo de redução dos íons $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ que difundem a partir da solução até a superfície do eletrodo; (ii) a carga proveniente do carregamento da dupla camada elétrica na interface eletrodo/solução e (iii) a carga devido à redução dos íons $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ ligados aos oligonucleotídeos imobilizados [304,310]:

$$Q = \frac{2nFAD_0^{1/2}C_0^*}{\pi^{1/2}}t^{1/2} + Q_{dl} + nFA\Gamma_0$$

Nesta equação, n é o número de elétrons transferidos por espécie eletroativa em solução, F é a constante de Faraday ($96.485 \text{ C mol}^{-1}$), A é a área geométrica do eletrodo ($0,24 \text{ cm}^2$, no presente caso), D_0 é o coeficiente de difusão das espécies $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), C_0^* é a concentração de íons $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (mol cm^{-3}), Q_{dl} é a carga da dupla camada (C), e $nFA\Gamma_0$ é a carga a partir da redução dos cátions $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ confinados na superfície do eletrodo, a qual é dependente do excesso superficial Γ_0 dos mesmos. Após regressão da porção linear do gráfico de Q vs. $t^{1/2}$ (diagrama de Anson) e extrapolação em $t^{1/2} = 0$, o intercepto resultante corresponde à soma dos termos Q_{dl} e $nFA\Gamma_0$. O excesso superficial Γ_0 referente aos cátions $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ pode ser então determinado a partir da diferença entre os valores dos interceptos obtidos em experimentos realizados na presença e na ausência do marcador redox (neste caso, assume-se que o termo Q_{dl} é semelhante em ambas as situações). O excesso superficial resultante é a seguir convertido à estimativa do número de moléculas de DNA ligadas ao AuE a partir da seguinte equação:

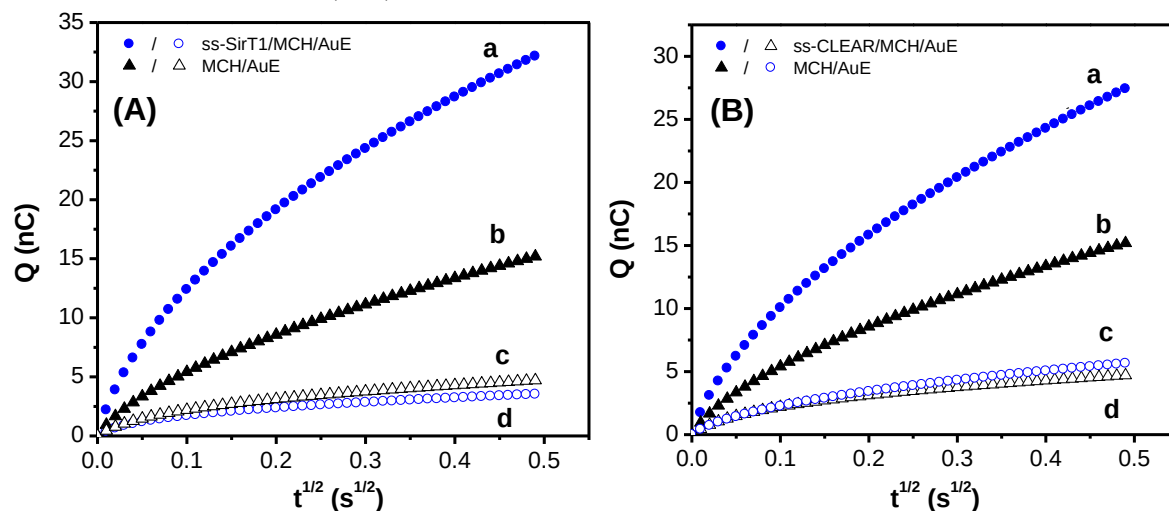
$$\Gamma_{DNA} = \Gamma_0(z/m)N_A$$

onde Γ_{DNA} é a estimativa do número de moléculas DNA imobilizadas (moléculas cm^{-2}), m é o número de pares de base da sequência sob estudo, z é a carga do marcador redox e N_A é o número de Avogadro.

Os resultados obtidos após as medidas de cronocoulometria para o sf-SIRT1/MCH/AuE e para o sf-CLEAR/MCH/AuE obtidas na presença e na ausência de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ são mostrados na Figura 3.8. Como controle, empregou-se um AuE modificado

unicamente com uma SAM de MCH (MCH/AuE). Verificou-se, neste caso, que o intercepto obtido na presença e na ausência do marcador redox foram próximos ($3,8 \times 10^{-9}$ e $2,1 \times 10^{-9}$, respectivamente), o que sugere que os íons $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ não adsorvem de maneira significativa à monocamada de MCH na ausência das sequências de DNA estudadas.

Figura 3.8 – Diagramas de Anson obtidos para o (A) sf-SIRT1/MCH/AuE, (B) sf-CLEAR/MCH/AuE e o MCH/AuE (controle) em tampão Tris 10 mmol L⁻¹ pH 7,4 na presença (a e b) e na ausência (c e d) de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do marcador redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$.



Fonte: O autor.

Empregando o método descrito, o recobrimento superficial dos AuE com os oligonucleotídeos CLEAR e SIRT1 foi estimado como sendo aproximadamente igual a $32,2 \pm 3,2 \times 10^{12}$ e $23,9 \pm 2,8 \times 10^{12}$ moléculas cm⁻², respectivamente. Os valores encontrados são comparáveis a outros previamente reportados na literatura em trabalhos que relatam a modificação de AuE com SAM mistas de tiois e sequências de DNA [113,117,310–312].

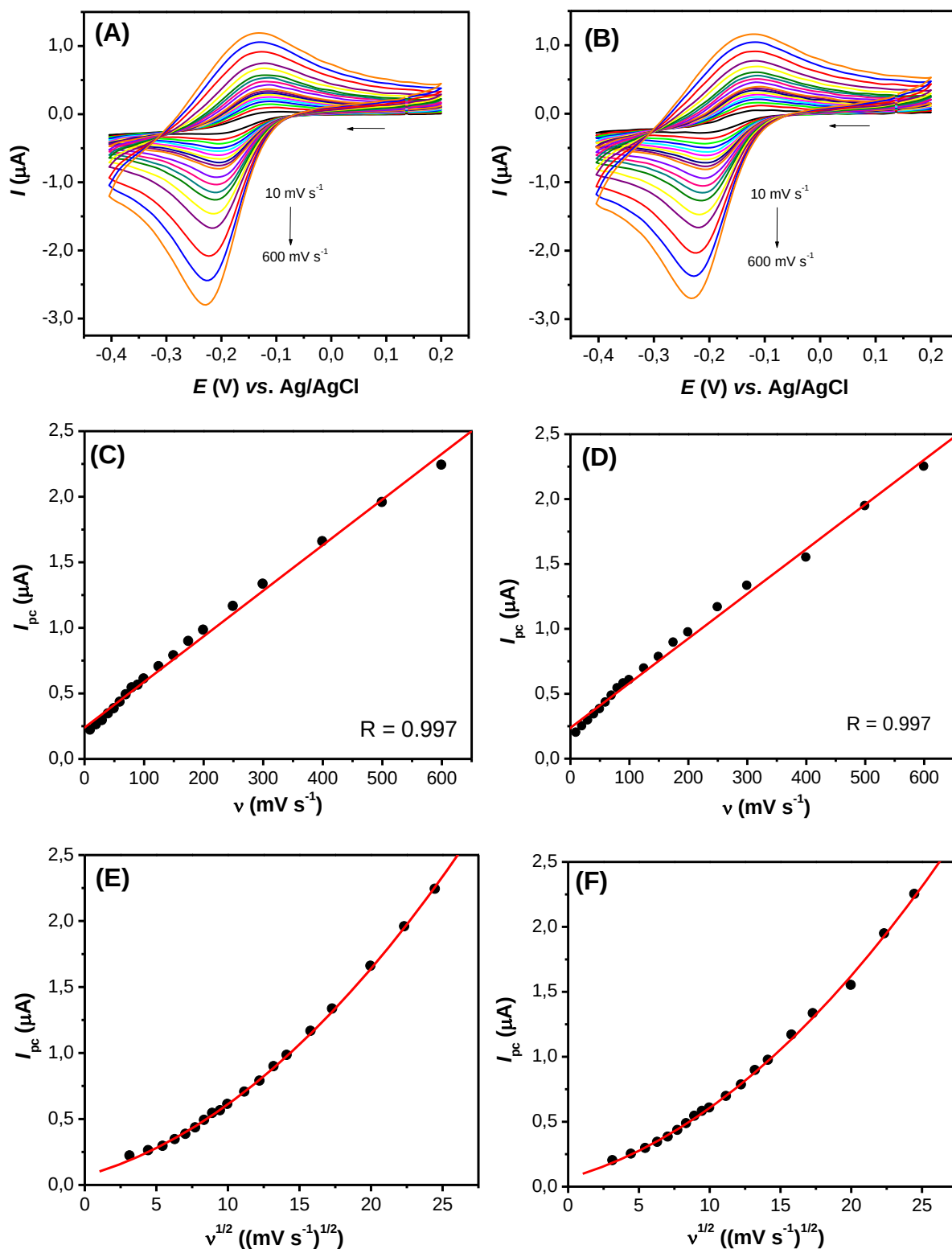
Verifica-se que o número de moléculas imobilizadas no caso da sequência CLEAR foi superior à sequência SIRT1, o que pode ser justificado considerando-se o tamanho de cada sequência. Uma vez que o oligonucleotídeo SIRT1 consiste em uma sequência mais longa (30 pb) comparado à CLEAR (18 pb), pode-se assumir que um certo impedimento estérico entre as cadeias de SIRT1 pode ter ocorrido e parcialmente impedido a ligação de mais moléculas de DNA na superfície do AuE. Por exemplo, algumas moléculas do oligonucleotídeo SIRT1 podem ter se arranjado de forma dobrada ou inclinada, de modo a dificultar a ligação de novas moléculas à superfície do AuE. Por outro lado, devido à sua menor extensão, a sequência CLEAR pode adotar um arranjo mais organizado a partir da sua ligação ao AuE, o que, portanto, pode levar a um recobrimento mais eficiente quando comparado ao valor obtido para o caso da

SIRT1. Um comportamento similar pode ser observado no trabalho de Tersch e Lisdat [113], onde sequências de DNA mais curtas conduziram a um maior recobrimento em AuE ao se comparar com sequências mais longas.

3.4.1.3 Influência da velocidade de varredura de potencial

A fim de se determinar se o processo redox dos íons $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ sobre o df-CLEAR/MCH/AuE e o df-SIRT1/MCH/AuE é controlado por adsorção ou difusão, voltamogramas cíclicos em diferentes valores de velocidade de varredura (10 mV s^{-1} a 600 mV s^{-1}) foram obtidos. É bem conhecido da literatura que a corrente proveniente de processos redox que são controlados por mecanismos adsortivos varia de maneira linear com o valor da velocidade de varredura, enquanto que para processos que ocorrem por difusão a variação da corrente dá-se de maneira linear com a raiz quadrada da velocidade de varredura [186]. Como mostrado na Figura 3.9, pode-se verificar que tanto para o df-SIRT1/MCH/AuE quanto para o df-CLEAR/MCH/AuE, os picos de corrente aumentaram de maneira linear com o incremento na velocidade de varredura, sugerindo que o processo redox dos íons da sonda eletroquímica empregada foi controlado por adsorção em ambas as superfícies (df-SIRT1/MCH/AuE: $I_{\text{pc}} = 0,24 + 0,003 v$; $R = 0,997$; df-CLEAR/MCH/AuE: $I_{\text{pc}} = 0,23 + 0,003 v$; $R = 0,996$). O comportamento adsortivo foi confirmado pelo fato de que os gráficos de I_{pc} vs. $v^{1/2}$ para ambos os oligonucleotídeos não mostraram uma relação linear entre as duas variáveis. Desta maneira, corrobora-se o mecanismo previamente descrito para a redução dos íons $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, no qual primeiramente as espécies eletroativas adsorvem sobre as sequências de DNA imobilizadas por meio de interações eletrostáticas para que então o processo de redução e transferência eletrônica possa acontecer.

Figura 3.9 – Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes valores de velocidade de varredura (de 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 125; 150; 175; 200; 250; 300; 400; 500; e 600 mV s^{-1}) para o (A) df-SIRT1/MCH/AuE e (B) df-CLEAR/MCH/AuE. Relações de I_{pc} vs. v e de I_{pc} vs. $v^{1/2}$ para o df-SIRT1/MCH/AuE (C e E) e para o df-CLEAR/MCH/AuE (D e F) (eletrólito suporte: tampão PBS 0,15 mol L^{-1} em pH 7,4 contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$).



Fonte: O autor.

3.4.2 Estudos de Interação com Isoformas de ApoE

3.4.2.1 Interação da ApoE4 com as simples- ou duplas-fitas das sequências CLEAR e SIRT1

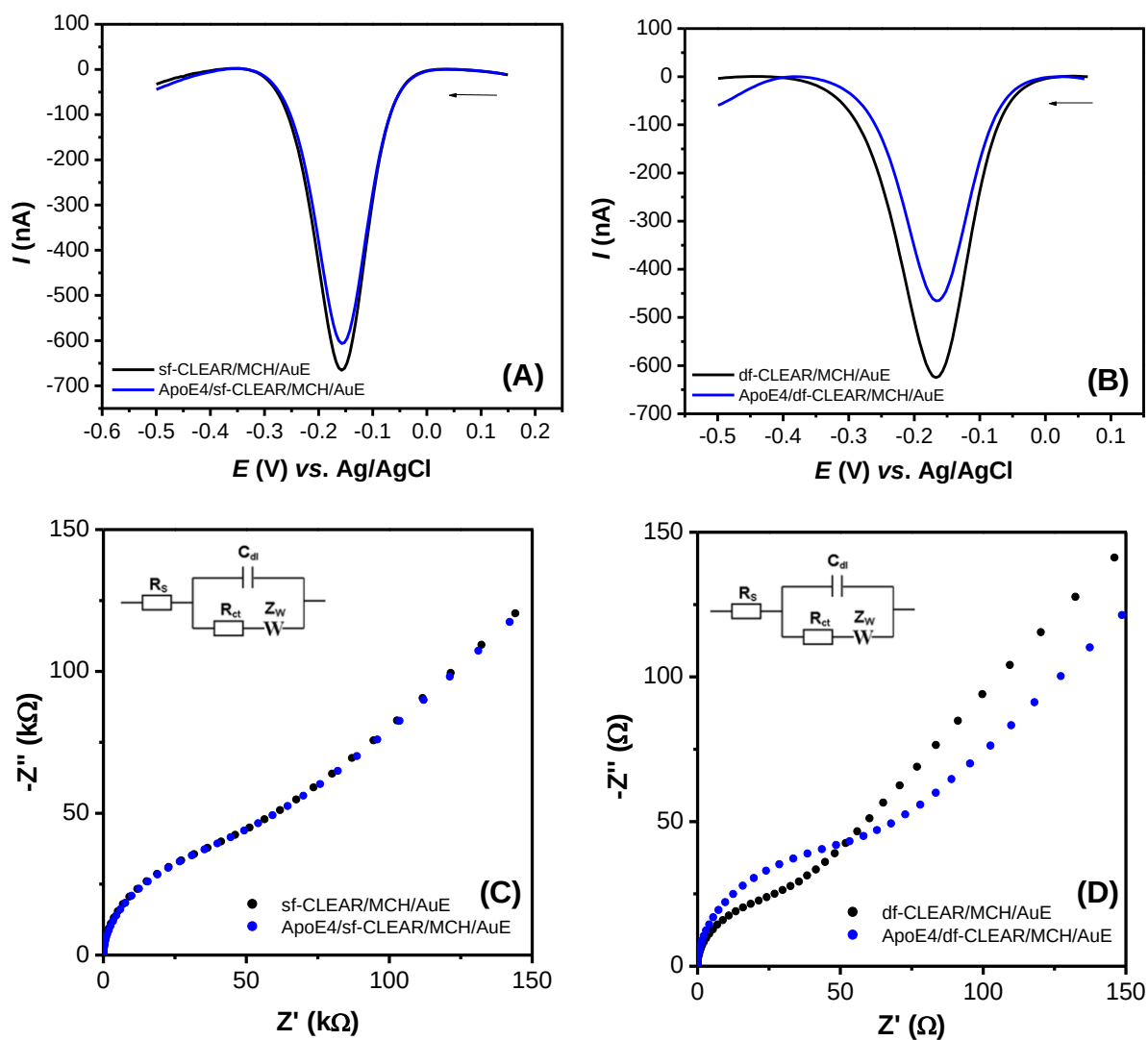
Considerando-se o papel marcante que a isoforma ApoE4 possui em relação ao desenvolvimento da DAz, e seu comprovado potencial de inibir a transcrição de proteínas envolvidas em mecanismos de autofagia celular e de neuroproteção, estudos de interação da mesma com a simples- e dupla-fita dos oligonucleotídeos CLEAR e SIRT1 foram realizados, empregando-se as técnicas de VPD e EIE. De maneira geral, a interação de uma dada proteína com moléculas de DNA (e também com outros ligantes) depende simultaneamente da sequência de aminoácidos nas cadeias polipeptídicas e da superfície da mesma [313], a qual é caracterizada por padrões complexos e irregulares onde protuberâncias, bolsões e cavidades estão presentes [314].

Para proteínas que se ligam ao DNA, a presença de cavidades em sua superfície pode possuir um papel fundamental em relação à interação com as simples- ou duplas-fitas. Neste sentido, do ponto de vista de sua estrutura terciária, uma proteína que se liga somente à simples-fita de DNA deve apresentar cavidades que são estreitas o suficiente para prevenir sua ligação com a dupla-fita [314]. Outro aspecto interessante, referente a proteínas que interagem especificamente com o duplex de DNA, é que tal interação geralmente acontece majoritariamente com o sulco maior do mesmo, devido a uma maior exposição de grupos funcionais que identificam pares de bases específicos neste ponto da cadeia [315].

Pode-se verificar que decréscimos na I_{pc} (ΔI_{pc}) e aumentos na R_{ct} (ΔR_{ct}) ocorreram após a incubação dos eletrodos modificados com as sequências CLEAR e SIRT1, tanto na forma de simples-fita quanto de dupla-fita, na presença da ApoE4 (Figura 3.10 e 3.11 e Tabela 3.3). Este comportamento é um indicativo da existência de interações entre a proteína estudada e as sequências imobilizadas, e é consequência do bloqueio do acesso das espécies $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ à superfície do eletrodo a partir da ligação da proteína mencionada. Entretanto, os decréscimos na I_{pc} e aumentos de R_{ct} observados para os eletrodos df-CLEAR/MCH/AuE e df-SIRT1/MCH/AuE foram significativamente superiores aos verificados para os eletrodos sf-CLEAR/MCH/AuE e sf-SIRT1/MCH/AuE ($p < 0.05$). Neste sentido, é possível afirmar que a dupla-fita das sequências CLEAR e SIRT1 mostrou interações mais fortes com a ApoE4 comparando-se com as respostas obtidas nos estudos com a simples-fita. Este comportamento está de acordo com trabalhos previamente reportados [285,286], e sugere que a ApoE4 provavelmente contém domínios estruturais específicos que minimizam a sua ligação à simples-

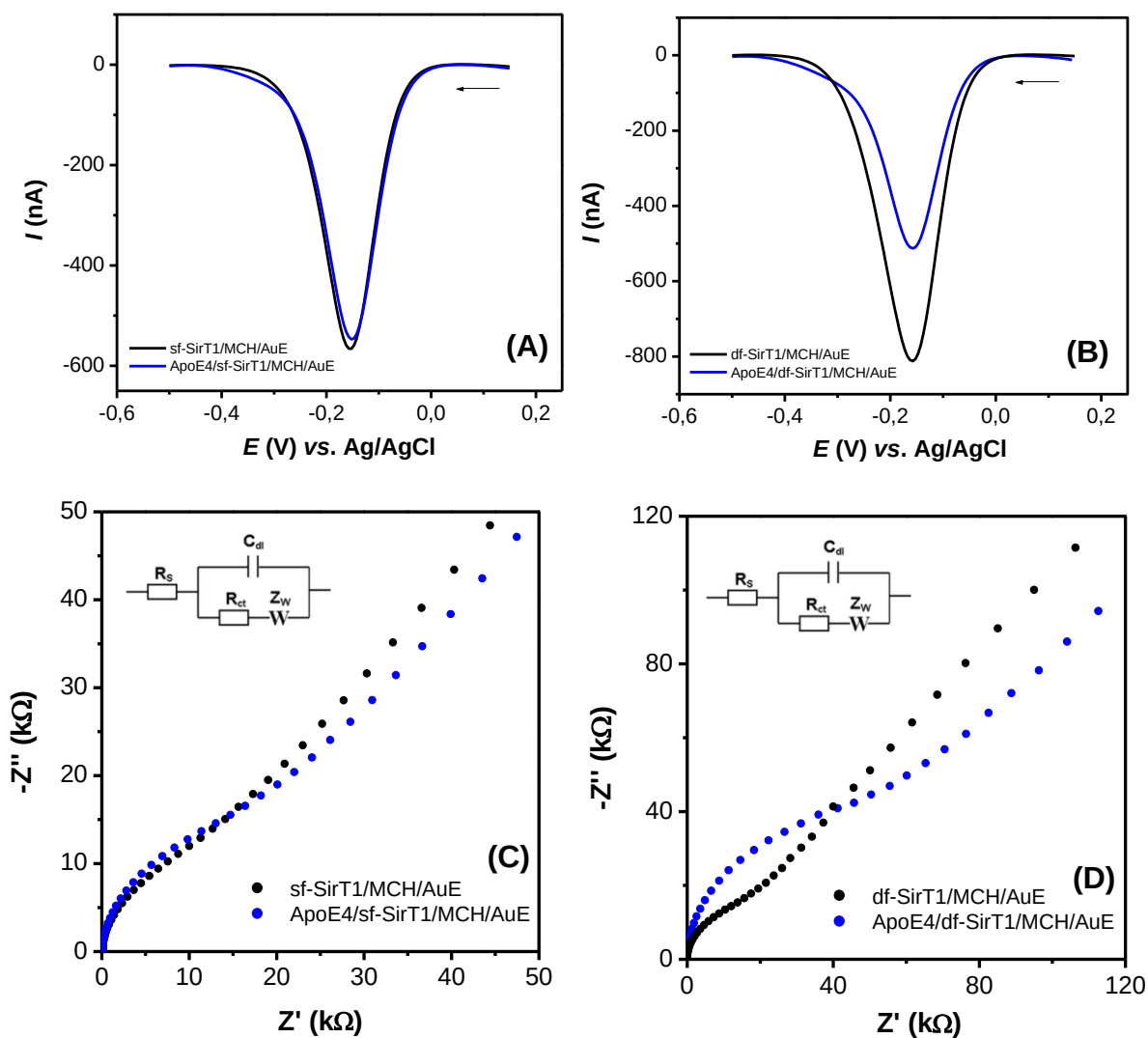
fita de DNA. Além disso, as mudanças conformacionais na estrutura tanto da proteína quanto dos oligonucleotídeos resultantes do evento de interação [313] podem ter estabilizado os complexos formados entre os duplex de DNA e a ApoE4.

Figura 3.10 – Voltamogramas de pulso diferencial (A e B) e diagramas de Nyquist (C e D) obtidos no estudo de interação entre o sf-CLEAR/MCH/AuE ou df-CLEAR/MCH/AuE e ApoE4 (eletrólito suporte: tampão PBS 0,15 mol L⁻¹ em pH 7,4 na presença de 50 µmol L⁻¹ de [Ru(NH₃)₆]Cl₃).



Fonte: O autor.

Figura 3.11 – Voltamogramas de pulso diferencial (A e B) e diagramas de Nyquist (C e D) obtidos no estudo de interação entre o sf-SIRT1/MCH/AuE ou df-SIRT1/MCH/AuE e ApoE4 (eletrólito suporte: tampão PBS 0,15 mol L⁻¹ em pH 7,4 na presença de 50 μmol L⁻¹ de [Ru(NH₃)₆]Cl₃).



Fonte: O autor.

Tabela 3.3 – Valores de ΔI_{pa} e ΔR_{ct} ($n = 3$) para os AuE modificados com as simples- e duplas-fitas dos oligonucleotídeos CLEAR e SIRT1 após incubação na presença de 1 μmol L⁻¹ de ApoE4.

Eletródo	ΔI_{pa} (%)	ΔR_{ct} (%)
sf-CLEAR/MCH/AuE	$7,7 \pm 3,0$ b	$19,5 \pm 4,3$ b
df-CLEAR/MCH/AuE	$23,8 \pm 2,0$ a	$42,0 \pm 3,5$ a
sf-SIRT1/MCH/AuE	$7,5 \pm 2,3$ b	$36,9 \pm 5,0$ b
df-SIRT1/MCH/AuE	$36,5 \pm 2,2$ a	$71,3 \pm 5,3$ a

Nota: Em cada coluna, valores de ΔI_{pc} e ΔR_{ct} seguidos por letras diferentes (**a** e **b**) diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

3.4.2.2 Interação dos oligonucleotídeos SIRT1 e CLEAR com as diferentes isoformas de ApoE

A seguir, estudos de interação entre o df-CLEAR/MCH/AuE e do df-SIRT1/MCH/AuE e as diferentes isoformas de ApoE (ApoE4, ApoE3 e ApoE2) foram realizados empregando-se as técnicas de VPD e EIE. Para tanto, os eletrodos foram incubados, separadamente, na presença de cada uma das proteínas mencionadas, e as variações percentuais na I_{pc} (ΔI_{pc}) e na R_{ct} (ΔR_{ct}) (referentes ao processo redox dos íons $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$) resultantes foram calculadas. A fim de se avaliar a especificidade das interações das sequências imobilizadas com as isoformas de ApoE, eletrodos modificados com sequências do tipo *scrambled* foram utilizados (df-SCR/MCH/AuE), assim como eletrodos modificados com SAM somente de MCH (MCH/AuE).

No caso do promotor SIRT1, as medidas de VPD e EIE evidenciaram a ocorrência de interações significativas entre todas as isoformas estudadas de ApoE e a sequência imobilizada, as quais geraram valores de ΔI_{pc} e R_{ct} que foram de três a cinco vezes maiores quando comparados aos obtidos para os controles df-SCR/MCH/AuE e MCH/AuE ($p < 0,05$; Figura 3.12 e Tabela 3.4). Além disso, é possível notar que as afinidades aumentaram na seguinte ordem: ApoE2 < ApoE3 < ApoE4. Considerando que nenhuma das isoformas mostrou interagir de modo significativo com o df-SCR/MCH/AuE e com o MCH/AuE, é possível afirmar que as mesmas comportam-se de modo específico no que diz respeito ao estabelecimento de interações com a sequência SIRT1. Um comportamento similar ao observado foi reportado por Theendakara e colaboradores [285], onde interações fortes entre o oligonucleotídeo SIRT1 e as proteínas ApoE4 e ApoE3 foram verificadas empregando as técnicas de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) e ressonância *plasmon* de superfície (SPR) ($K_D = 3$ nM para ApoE4 e ApoE3). Os autores também demonstraram que interações do tipo proteína-proteína não ocorrem entre a Sirt1 e tanto a ApoE4 quanto à ApoE3, o que sugere que as duas isoformas de ApoE estudadas podem interferir na expressão de Sirt1 a nível de transcrição [285].

Figura 3.12 – Gráficos comparativos dos valores de ΔI_{pa} (A) e ΔR_{ct} (B) apresentados pelo df-SIRT1/MCH/AuE após incubação na presença de ApoE4, ApoE3 e ApoE2 ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$ para cada proteína). AuEs modificados apenas com uma SAM de MCH (MCH/AuE) e com SAMs mistas das sequências *scrambled* (SCR) com MCH (df-SCR/MCH/AuE) foram usados como controles (n = 3).

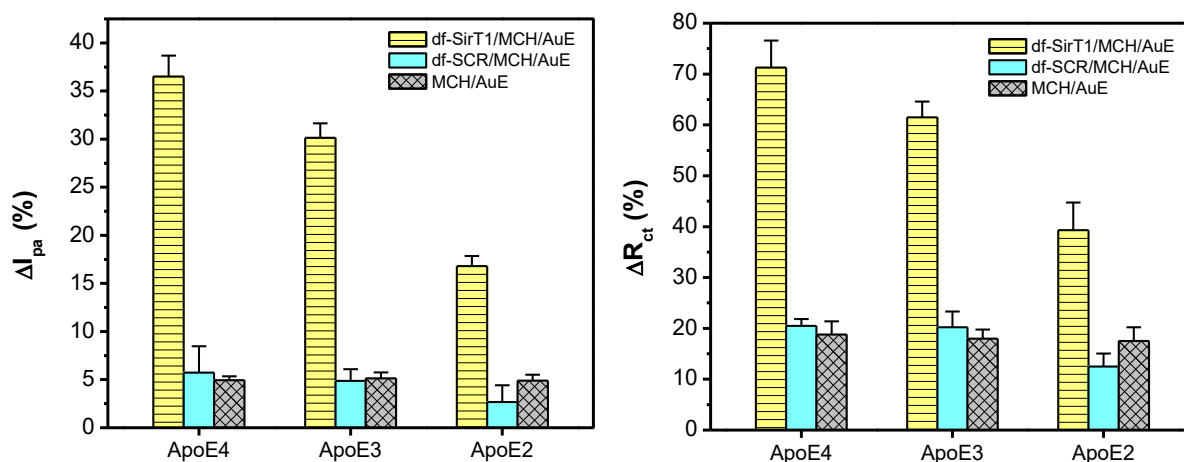


Tabela 3.4 – Valores de ΔI_{pa} e ΔR_{ct} obtidos para o df-SIRT1/MCH/AuE, df-SCR/MCH/AuE e MCH/AuE após incubação na presença de ApoE4, ApoE3 e ApoE2 ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$ para cada proteína).

Electrode	ApoE4		ApoE3		ApoE2	
	ΔI_{pc} (%)	ΔR_{ct} (%)	ΔI_{pc} (%)	ΔR_{ct} (%)	ΔI_{pc} (%)	ΔR_{ct} (%)
ds-SIRT1/MCH/AuE	36,5 ± 2,2 a	71,3 ± 5,3 a	30,1 ± 1,5 a	68,4 ± 5,1 a	16,8 ± 1,0 a	39,3 ± 5,4 a
ds-SCR/MCH/AuE	5,7 ± 2,7 b	20,5 ± 1,4 b	4,9 ± 1,2 b	20,2 ± 3,1 b	2,7 ± 1,8 b	12,5 ± 2,5 b
MCH/AuE	4,9 ± 0,4 b	18,8 ± 2,6 b	5,1 ± 0,6 b	18,0 ± 1,8 b	4,9 ± 0,6 b	17,5 ± 2,7 b

Nota: Em cada coluna, valores de ΔI_{pc} e ΔR_{ct} seguidos por letras diferentes (a e b) diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p < 0.05).

Os resultados obtidos por VPD e EIE neste trabalho sugerem que as três isoformas de ApoE testadas podem estabelecer interações com sequência promotora SIRT1, e, desta maneira, afetar sua atividade, sendo que um efeito mais pronunciado parece ser exercido neste caso pela ApoE4 em comparação às demais proteínas. De fato, estudos previamente reportados [284] provaram que a expressão de Sirt1 foi significativamente reduzida na presença de ApoE3 e ApoE4.

A existência de interações do tipo SIRT1-ApoE pode ser considerada uma evidência de que as isoformas estudadas podem também atuar como proteínas de ligação ao DNA, e exercer efeitos transcricionais repressivos relacionados à biossíntese de Sirt1. Uma vez que a expressão de Sirt1 possui um reconhecido papel em mecanismos celulares neuroprotetores (principalmente por meio da atenuação da produção de fragmentos do peptídeo β A e de formas hiperfosforiladas da proteína tau) [316–319], é possível dizer que qualquer interferência em sua

expressão pode aumentar as chances de acumulação de agregados proteicos tóxicos em células neuronais e então favorecer o início do desenvolvimento da DAiz.

As interações entre o oligonucleotídeo SIRT1 e as isoformas de ApoE provavelmente ocorreram pela formação de ligações de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos das proteínas estudadas com a sequência imobilizada. Além disso, pode-se considerar neste caso o possível estabelecimento de interações eletrostáticas entre as biomoléculas em questão. Resíduos de arginina positivamente carregados podem interagir fortemente com grupos fosfatos, possibilitando a formação de interações estáveis com a sequência estudada [320]. De fato, é conhecido da literatura que proteínas de ligação ao DNA geralmente apresentam uma elevada quantidade de resíduos de arginina [285]. Esta informação também pode ajudar a justificar a tendência de afinidade observada entre as isoformas de ApoE e a sequência SIRT1, uma vez que a ApoE4 e a ApoE3 apresentam uma maior quantidade de arginina em comparação à ApoE2 [249]. Adicionalmente às interações eletrostáticas, a presença de resíduos de arginina pode aumentar o número de ligações de hidrogênio estabelecidas entre as isoformas de ApoE e os oligonucleotídeos, devido à presença do grupo guanidino em suas cadeias laterais [315].

É importante destacar também que a estrutura secundária de todas as isoformas de ApoE é caracterizada pela presença de motivos do tipo hélice-volta-hélice [285] (uma α -hélice curta conectada a uma α -hélice mais longa por meio de uma pequena cadeia de aminoácidos) (Figura 3.13), o qual possui uma reconhecida afinidade pelo DNA, estando presente em muitas proteínas que atuam como fatores de transcrição [320]. Nesta interação, a α -hélice denominada como hélice de reconhecimento se liga a nucleotídeos do sulco maior do DNA a partir do estabelecimento de ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, enquanto que a outra α -hélice estabiliza a interação entre a proteína e a sequência, sem desempenhar um papel direto no evento de reconhecimento [321,322].

Figura 3.13 – Representação do modo de interação do motivo hélice-volta-hélice com o duplex de DNA.



Fonte: Adaptado da referência [322].

Em relação à sequência CLEAR, verificou-se, tanto por VPD quanto por EIE, que esta interagiu de modo significativo com a ApoE4, uma vez que variações de I_{pc} e R_{ct} significativamente maiores foram observadas neste caso em comparação às variações resultantes da interação da proteína mencionada com o df-SCR/MCH/AuE e com o MCH/AuE ($p < 0,05$; Figura 3.14 e Tabela 3.5). O decréscimo na I_{pc} e aumento na R_{ct} foram devidos, assim como já sugerido, ao bloqueio da superfície eletródica por conta da ligação da ApoE4 à sequência CLEAR imobilizada no AuE.

Por outro lado, menores valores de ΔI_{pa} e ΔR_{ct} resultaram da incubação do df-CLEAR/MCH/AuE na presença de ApoE3 e ApoE2, os quais foram estatisticamente equivalentes aos obtidos para o df-SCR/MCH/AuE e para o MCH/AuE ($p > 0.05$). Deste modo, é possível afirmar que a sequência CLEAR interagiu de modo específico com apenas com a ApoE4, e que apenas interações não-significativas e não-específicas foram formadas com as isoformas ApoE3 e ApoE2. Os resultados obtidos estão de acordo com os reportados no trabalho de Parcon e colaboradores [286], onde estudos realizados *in silico* (*docking* molecular) e *in vitro* (ensaios *pull-down* e de desvio de mobilidade eletroforética) demonstraram que os oligonucleotídeos CLEAR interagiram de modo específico somente com a ApoE4, por meio da formação de ligações de hidrogênio, ao passo que apenas interações fracas e instáveis foram observadas para a ApoE3 e nenhuma interação identificada no caso da ApoE2. De modo específico, os autores verificaram que a ApoE3 interagiu apenas com os grupos fosfatos da cadeia, enquanto a ApoE4, por sua vez, demonstrou múltiplas interações com os pares de base da sequência [286].

Figura 3.14 – Gráficos comparativos dos valores de ΔI_{pa} (A) e ΔR_{ct} (B) apresentados pelo df-CLEAR/MCH/AuE após incubação na presença de ApoE4, ApoE3 e ApoE2 ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$ para cada proteína). AuEs modificados apenas com uma SAM de MCH (MCH/AuE) e com SAMs mistas das sequências *scrambled* (SCR) com MCH (df-SCR/MCH/AuE) foram usados como controles ($n = 3$).

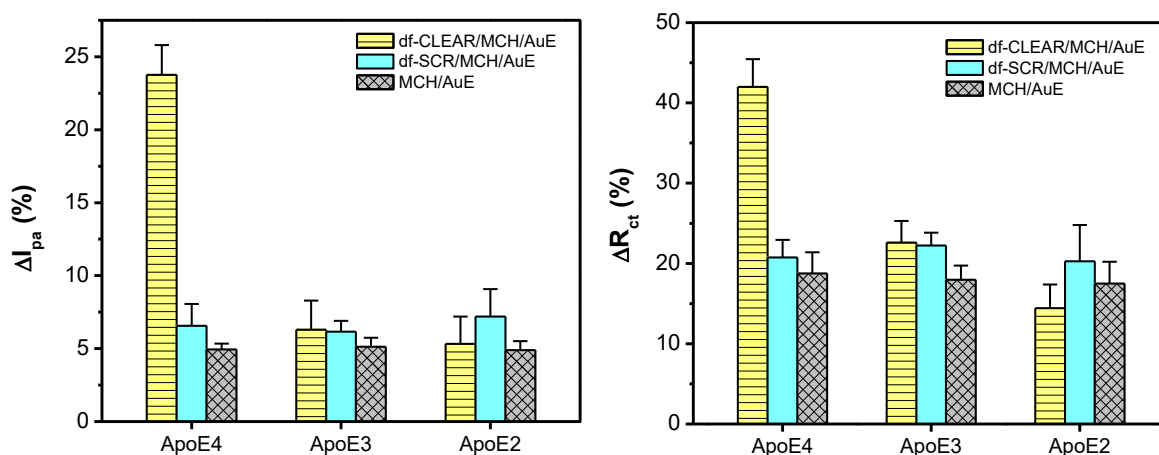


Tabela 3.5 – Valores de ΔI_{pc} e ΔR_{ct} obtidos para o df-CLEAR/MCH/AuE, df-SCR/MCH/AuE e MCH/AuE após incubação na presença de ApoE4, ApoE3 e ApoE2 (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para cada proteína).

Eletrodo	ApoE4		ApoE3		ApoE2	
	ΔI_{pc} (%)	ΔR_{ct} (%)	ΔI_{pc} (%)	ΔR_{ct} (%)	ΔI_{pc} (%)	ΔR_{ct} (%)
ds-CLEAR/MCH/AuE	23,8 $\pm$ 2,0 a	42,0 $\pm$ 3,5 a	6,3 $\pm$ 2,0 a	22,6 $\pm$ 2,7 a	5,3 $\pm$ 1,8 a	14,4 $\pm$ 3,0 a
ds-SCR/MCH/AuE	6,6 $\pm$ 1,5 b	20,7 $\pm$ 2,2 b	6,2 $\pm$ 0,7 a	22,2 $\pm$ 1,6 a	7,2 $\pm$ 1,9 a	20,3 $\pm$ 4,5 a
MCH/AuE	4,9 $\pm$ 0,4 b	18,8 $\pm$ 2,6 b	5,1 $\pm$ 0,6 a	18,0 $\pm$ 1,8 a	4,9 $\pm$ 0,6 a	17,5 $\pm$ 2,7 a

Nota: Em cada coluna, valores de ΔI_{pc} e ΔR_{ct} seguidos por letras diferentes (*a* e *b*) diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Considerando o fato de que as diferentes isoformas de ApoE diferem entre si apenas por substituições entre resíduos de cisteína e arginina nas posições 112 e 158 da cadeia polipeptídica [249], pode-se sugerir que, neste caso, a ocorrência de dois resíduos de arginina nas posições mencionadas na estrutura da ApoE4 parece ser essencial para uma ligação mais efetiva desta isoforma ao oligonucleotídeo CLEAR. Particularmente, Parcon e colaboradores demonstraram que o resíduo de arginina-112 de fato exerce uma considerável influência no que diz respeito à interação com a sequência CLEAR [286]. Uma vez que a ApoE3 apresenta resíduos de cisteína e arginina nas posições 112 e 158, respectivamente, e que apenas interações não significativas foram observadas entre esta proteína e a sequência CLEAR tanto por VPD quanto por EIE ($p > 0.05$), os resultados aqui apresentados também sugerem que o resíduo de arginina-112 de fato aparenta possuir um papel fundamental na interação ApoE4-CLEAR. Neste sentido, é possível sugerir, por exemplo, que a presença de arginina nesta posição pode ser importante para a manutenção de uma conformação proteica adequada que permite a ligação da ApoE4 de forma mais efetiva ao oligonucleotídeo CLEAR, e, por consequência, a formação de um complexo mais estável do que aqueles formados com as isoformas ApoE3 e ApoE2.

O estabelecimento de interações mais fortes entre a ApoE4 e a sequência CLEAR comparadas ao caso da ApoE3 e da ApoE2 pode, portanto, ser relacionado à influência que a ApoE4 exerce em processos de autofagia celular. Deste modo, a ApoE4 poderia agir como um repressor de transcrição, inibindo a ligação do fator de transcrição EB (TFEB) ao oligonucleotídeo CLEAR [286], e então a expressão de proteínas essenciais para a ocorrência do processo mencionado, como p62, LC3B e LAMP2 [288,323]. Como resultado, o processo pode ser reprimido, e isto pode ser diretamente associado à degradação ineficiente de elementos proteicos tóxicos relacionados à DAiz, como formas hiperfosforiladas da pTau [287] e peptídeos β A [323,324]. Portanto, a formação de complexos ApoE4-CLEAR pode ajudar a

explicar o depósito de placas senis do peptídeo β A e de emaranhados neurofibrilares da pTau no cérebro de pacientes carreadores do genótipo *APOE* $\epsilon 4/\epsilon 4$ [206,246,286].

A especificidade exibida pela sequência CLEAR em relação à ApoE4 e a maior afinidade do oligonucleotídeo SIRT1 em relação à mesma também são um indicativo de que as diferenças significativas em sua estrutura terciária comparado às outras duas isoformas [234,249] pode ser um fator determinante para a formação de complexos ApoE-DNA mais estáveis. Neste sentido, tais variações estruturais podem ter criado cavidades na estrutura da ApoE4 que favoreceram sua ligação às sequências de DNA estudadas. Valendo-se desta especificidade de ligação, pode-se dizer que os dispositivos desenvolvidos apresentam o potencial de serem aplicados como biossensores para a detecção da presença da ApoE4 em plasma, fornecendo assim evidências da predisposição de desenvolvimento da DAz em pacientes.

Os maiores valores de ΔI_{pa} e ΔR_{ct} observados após a interação da ApoE4 com a sequência SIRT1 em comparação à CLEAR podem ser atribuídos ao tamanho dos oligonucleotídeos imobilizados. Dado que as sequências SIRT1 e CLEAR são constituídas por um total de 30 e 18 pares de base, respectivamente, é possível sugerir que um maior número de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre o oligonucleotídeo SIRT1 e a ApoE4 foi formado em relação à CLEAR. Isto possivelmente levou à ligação de uma maior quantidade de biomoléculas à SIRT1, o que dificultou a aproximação dos íons $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ e sua chegada à superfície do AuE para a realização do processo de transferência eletrônica. Como consequência, menores valores de I_{pc} e R_{ct} foram obtidos, o que conduziu às maiores variações de sinal registradas.

3.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste capítulo, relatou-se o desenvolvimento de um ensaio eletroquímico para a investigação da ocorrência de interações do tipo proteína-DNA entre três isoformas de ApoE (ApoE4, ApoE3 e ApoE2) e as sequências SIRT1 e CLEAR (associadas à transcrição de genes envolvidos na expressão da proteína neuroprotetora Sirt1 e de proteínas envolvidas em processos de autofagia celular, respectivamente), as quais podem estar envolvidas no desenvolvimento da DAz em pacientes idosos.

O ensaio foi baseado na imobilização dos oligonucleotídeos mencionados (funcionalizados na extremidade 5' com uma cadeia saturada de seis carbonos ligada a um grupo tiol) em AuEs na forma de SAMs mistas com MCH, a partir da formação de ligações

covalentes estáveis do tipo Au-S. As superfícies modificadas foram caracterizadas por meio das técnicas de VPD, EIE, VC e cronocoulometria na presença do marcador eletroquímico $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, sendo que os resultados obtidos sugeriram que os eletrodos foram eficazmente modificados com os oligonucleotídeos SIRT1 e CLEAR, viabilizando, portanto, a sua aplicação para o estudo da interação das mesmas com as isoformas de ApoE.

Monitorando-se as variações de I_{pc} e R_{ct} referentes à redução dos cátions $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ por meio de medidas de VPD e EIE, verificou-se que as duplas-hélices dos oligonucleotídeos SIRT1 interagiram com todas as isoformas de ApoE estudadas, mostrando uma tendência de afinidade segundo a ordem: ApoE4 > ApoE3 > ApoE2. Interessantemente, observou-se que a dupla-fita da sequência CLEAR interagiu especificamente apenas com a isoforma ApoE4, e que não apresentou interações significativas com a ApoE3 e a ApoE2. Os resultados obtidos concordaram com os apresentados em outros estudos previamente reportados, e demonstraram que a ApoE4 apresenta afinidade em relação a ambas as sequências de DNA estudadas, podendo interagir com as mesmas e então afetar a síntese de proteínas envolvidas em mecanismos celulares neuroprotetores e de autofagia, o que pode levar ao aumento de agregados proteicos tóxicos em células neuronais e consequentemente ao desenvolvimento da Dalz.

Por fim, conclui-se que o emprego de superfícies condutoras modificadas com oligonucleotídeos aliado a técnicas eletroquímicas tais como a VPD e a EIE consiste em uma ferramenta promissora para o estudo de interações do tipo proteína-DNA envolvidas na Dalz, sendo capaz de proporcionar evidências de como a presença da ApoE4 pode influenciar na maior probabilidade de desenvolvimento da doença, além de ajudar a elucidar possíveis fatores que favorecem a sua ocorrência em pacientes idosos.

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

4.1 CONCLUSÕES FINAIS

Neste trabalho, relatou-se a construção, caracterização e aplicação de biossensores eletroquímicos à base de materiais carbonáceos e inorgânicos como transdutores ou modificadores. Valendo-se de características como simplicidade de operação, sensibilidade, especificidade, e o fato de consistirem em sistemas do tipo *label-free*, os dispositivos desenvolvidos mostraram-se promissores para a detecção de biomarcadores e eventos de interação entre biomoléculas de relevância biológica e clínica.

Eletrodos de carbono vítreo oxidados e modificados com AuNPs-ARG mostraram ser uma plataforma atrativa para a imobilização covalente de anticorpos para a detecção do hormônio esteroide DHEAS, conhecido biomarcador de CCA. O imunossensor desenvolvido mostrou-se estável e com boa sensibilidade ao analito mencionado, além de níveis satisfatórios de exatidão, precisão e especificidade. Tais características permitiram sua aplicação na quantificação de DHEAS em amostras de plasma de pacientes portadores da mutação TP53 R337H, sugerindo o seu potencial como uma ferramenta alternativa para o diagnóstico precoce de CCA, principalmente em crianças.

O emprego da técnica de SAM permitiu a imobilização de oligonucleotídeos relacionados à expressão de proteínas envolvidas em mecanismos celulares neuroprotetores (SIRT1) e em processos autofágicos (CLEAR) em AuEs, juntamente com MCH como agente espaçador. Os biossensores construídos permitiram a realização de estudos por VPD e EIE visando a detecção da interação entre o duplex de tais fragmentos de DNA e as isoformas ApoE4, ApoE3 e ApoE2, as quais são reconhecidas por sua relação com o desenvolvimento da DALz em pacientes idosos. Ambas as sequências mostraram interagir mais significativamente com a ApoE4, concordando com estudos reportados previamente.

É importante destacar a versatilidade apresentada pelo ouro, seja na forma de AuNPs ou como material eletródico, na construção dos biossensores desenvolvidos. No caso do imunossensor para CCA, as AuNPs-ARG conferiram à plataforma características atrativas como uma maior condutividade elétrica, maior área superficial, o que acarretou uma imobilização efetiva dos anticorpos e maior sensibilidade para o dispositivo. Para os biossensores à base de DNA, a utilização dos AuE possibilitou a imobilização dos oligonucleotídeos de forma organizada e estável por meio do estabelecimento de ligações

covalentes Au-S, o que levou à eficiência de hibridização e reconhecimento adequado de seus alvos proteicos.

De maneira geral, os resultados obtidos no presente trabalho evidenciaram que a construção de dispositivos eletroquímicos consiste em uma estratégia promissora e com atrativo potencial de aplicação em sistemas possibilitando tanto a determinação direta de biomarcadores visando o diagnóstico clínico precoce de enfermidades, quanto a detecção de eventos de interação do tipo proteína-DNA envolvidos em processos patológicos.

4.2 PERSPECTIVAS

Os resultados promissores obtidos com os biossensores apresentados abriram novas perspectivas de estudo que podem ser exploradas em trabalhos futuros, tanto em relação à síntese de novos tipos de nanomateriais, quanto ao desenvolvimento e aplicação de novas plataformas em sistemas bioanalíticos de detecção. Entre tais perspectivas, pode-se citar:

- Emprego de aminoácidos como lisina, cisteína ou metionina na síntese de AuNPs, e de ARG na produção de nanopartículas de outros metais (como platina, prata ou cobre);
- Avaliação das possíveis propriedades biomédicas das AuNPs-ARG e atividades biológicas das mesmas (antitumoral e antibacteriana);
- Emprego de técnicas voltamétricas (voltametria de onda quadrada e de pulso diferencial) para a determinação de DHEAS com o imunossensor ox-ECV/AuNPs-ARG/IgM;
- Emprego da plataforma ox-ECV/AuNPs-ARG para imobilização de outros anticorpos, como estratégia de construção de novos imunossensores para analitos clinicamente relevantes;
- Incorporação de compostos eletroativos (como complexos metálicos) às plataformas desenvolvidas para atuação como centros redox;
- Utilização da técnica de eletrodeposição de AuNPs sobre eletrodos de carbono como plataforma para imobilização de oligonucleotídeos funcionalizados;
- Realização de estudos por meio de técnicas como SPR e ITC para a determinação das constantes de afinidade entre as sequências SIRT1 e CLEAR e as diferentes isoformas de ApoE investigadas.

REFERÊNCIAS

- [1] GOODE, J. A.; RUSHWORTH, J. V. H.; MILLNER, P. A. Biosensor Regeneration : A Review of Common Techniques and Outcomes. **Langmuir**, v. 31, p. 6267–6276, 2015.
- [2] KIM, J. et al. Wearable biosensors for healthcare monitoring. **Nature Biotechnology**, v. 37, p. 389–406, 2019.
- [3] CARNEIRO, P. et al. Alzheimer's disease: Development of a sensitive label-free electrochemical immunosensor for detection of amyloid beta peptide. **Sensors & Actuators: B**, v. 239, p. 157–165, 2017.
- [4] BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. Label-free, ITO-based immunosensor for the detection of a cancer biomarker: receptor for activated C kinase 1. **Analyst**, v. 141, p. 5618–5626, 2016.
- [5] YANG, Y. et al. A novel label-free electrochemical immunosensor based on functionalized nitrogen-doped graphene quantum dots for carcinoembryonic antigen detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 90, p. 31–38, 2017.
- [6] RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 1747–1763, 2010.
- [7] SANATI, A. et al. A review on recent advancements in electrochemical biosensing using carbonaceous nanomaterials. **Microchimica Acta**, v. 186, p. 1–22, 2019.
- [8] CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, p. 29–45, 1962.
- [9] VIGNESHVAR, S. et al. Recent advances in biosensor technology for potential applications - an overview. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 4, p. 1–9, 2016.
- [10] DEVI, R. V.; DOBLE, M.; VERMA, R. S. Nanomaterials for early detection of cancer biomarker with special emphasis on gold nanoparticles in immunoassays/sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 688–698, 2015.
- [11] WONG, A. C.; WRIGHT, D. W.; CONRAD, J. A. Functionalized gold nanoparticles for detection of cancer biomarkers. In: PREEDY, V. R.; PATEL, V. B. (Eds.). **General Methods in Biomarker Research and their Applications**. Dordrecht: Springer, 2015.
- [12] LAOCHAROENSUK, R. Development of electrochemical immunosensors towards point-of-care cancer diagnostics: clinically relevant studies. **Electroanalysis**, v. 28, p. 1–15, 2016.
- [13] LUO, X.; DAVIS, J. J. Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 5944–5962, 2013.
- [14] COSTA, E.; COSTA-GARCÍA, A. Screen-printed electrochemical immunosensors for the detection of cancer and cardiovascular biomarkers. **Electroanalysis**, v. 28, p. 1–17, 2016.
- [15] GANESH, H. V. S.; CHOW, A. M.; KERMAN, K. Recent advances in biosensors for neurodegenerative disease detection. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 363–370, 2016.

- [16] BLOKHUIS, A. M. et al. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. **Acta Neuropathologica**, v. 125, p. 777–794, 2013.
- [17] ABDORAHIM, M. et al. Nanomaterials-based electrochemical immunosensors for cardiac troponin recognition : An illustrated review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 337–347, 2016.
- [18] WU, J. et al. Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 679–688, 2007.
- [19] CHEN, H. et al. Protein chips and nanomaterials for application in tumor marker immunoassays. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 3399–3411, 2009.
- [20] LIM, S. A.; AHMED, M. U. Electrochemical immunosensors and their recent nanomaterial-based signal amplification strategies: A review. **RSC Advances**, v. 6, p. 24995–25014, 2016.
- [21] FILIK, H.; AVAN, A. A. Electrochemical immunosensors for the detection of cytokine tumor necrosis factor alpha: a review. **Talanta**, v. 211, p. 120758, 2020.
- [22] MOLLARASOULI, F.; KURBANOGLU, S.; OZKAN, S. A. The role of electrochemical immunosensors in clinical analysis. **Biosensors**, v. 9, p. 1–19, 2019.
- [23] BALAHURA, L. R. et al. Advances in immunosensors for clinical applications. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 40, p. 40–51, 2019.
- [24] SADIGHBAYAN, D. et al. Recent advances on the DNA-based electrochemical biosensing of cancer biomarkers: Analytical approach. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 119, p. 115609, 2019.
- [25] CAMPUZANO, S.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Electrochemical genosensing of circulating biomarkers. **Sensors**, v. 17, p. 1–20, 2017.
- [26] BOWATER, R. P. et al. Biophysical and electrochemical studies of protein-nucleic acid interactions. **Monatshefte fur Chemie**, v. 146, n. 5, p. 723–739, 2015.
- [27] HASANZADEH, M.; SHADJOU, N. Advanced nanomaterials for use in electrochemical and optical immunoassays of carcinoembryonic antigen. A review. **Microchimica Acta**, v. 184, p. 389–414, 2017.
- [28] MEHRABANI, S.; MAKER, A. J.; ARMANI, A. M. Hybrid integrated label-free chemical and biological sensors. **Sensors**, v. 14, p. 5890–5928, 2014.
- [29] YU, X.; XU, D.; CHENG, Q. Label-free detection methods for protein microarrays. **Proteomics**, v. 6, p. 5493–5503, 2006.
- [30] JUSTINO, C. I. L.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Advances in point-of-care technologies with biosensors based on carbon nanotubes. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 45, p. 24–36, 2013.
- [31] WAN, Y. et al. Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 47, p. 1–11, 2013.
- [32] NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principios de Bioquímica de Lehninger**. 6th. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

- [33] SCHROEDER, H. W.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. S41–S52, 2010.
- [34] VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1–17, 2014.
- [35] BONDT, A. et al. Immunoglobulin G (IgG) Fab glycosylation analysis using a new mass spectrometric high-throughput profiling method reveals pregnancy-associated changes. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 13, n. 11, p. 3029–3039, 2014.
- [36] HARRIS, L. J. et al. **Structure of immunoglobulin**. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/structure/1IGT>>. Acesso em: 9 oct. 2019.
- [37] EHRENSTEIN, M. R.; NOTLEY, C. A. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 778–786, 2010.
- [38] CZAJKOWSKY, D. M.; SHAO, Z. The human IgM pentamer is a mushroom-shaped molecule with a flexural bias. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 14960–14965, 2009.
- [39] MARQUES, R. C. B. et al. Voltammetric immunosensor for the simultaneous analysis of the breast cancer biomarkers CA 15-3 and HER2-ECD. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 255, p. 918–925, 2018.
- [40] ORTEGA, F. G. et al. EGFR detection in extracellular vesicles of breast cancer patients through immunosensor based on silica-chitosan nanoplatform. **Talanta**, v. 194, p. 243–252, 2019.
- [41] FILIK, H.; AVAN, A. A. Nanostructures for nonlabeled and labeled electrochemical immunosensors: simultaneous electrochemical detection of cancer markers: A review. **Talanta**, v. 205, p. 120153, 2019.
- [42] TABRIZI, M. A. et al. A photoelectrochemical sandwich immunoassay for protein S100 β , a biomarker for Alzheimer's disease, using an ITO electrode modified with a reduced graphene oxide-gold conjugate and CdS-labeled secondary antibody. **Microchimica Acta**, v. 186, p. 1–9, 2019.
- [43] DIBA, F. S.; KIM, S.; LEE, H. J. Electrochemical immunoassay for amyloid-beta 1-42 peptide in biological fluids interfacing with a gold nanoparticle modified carbon surface. **Catalysis Today**, v. 295, p. 41–47, 2017.
- [44] FARIA, A. M.; MAZON, T. Early diagnosis of Zika infection using a ZnO nanostructures-based rapid electrochemical biosensor. **Talanta**, v. 203, p. 153–160, 2019.
- [45] LUNA, D. M. N. et al. Sensors and Actuators B : Chemical Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 220, p. 565–572, 2015.
- [46] KUMAR, B. et al. Label-free electrochemical detection of malaria-infected red blood cells. **RSC Advances**, v. 6, p. 75862–75869, 2016.
- [47] QIAN, X. et al. Facile and clean synthesis of dihydroxylatopillar[5]arene-stabilized gold nanoparticles integrated Pd/MnO₂ nanocomposites for robust and ultrasensitive detection of

cardiac troponin I. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 130, p. 214–224, 2019.

[48] AKTER, R. et al. Femtomolar detection of cardiac troponin I using a novel label-free and reagent-free dendrimer enhanced impedimetric immunosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 91, p. 637–643, 2017.

[49] LV, H. et al. An electrochemical sandwich immunosensor for cardiac troponin I by using nitrogen/sulfur co-doped graphene oxide modified with Au@Ag nanocubes as amplifiers. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 7, 2019.

[50] SAHA, K. et al. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 2739–2779, 2012.

[51] AUSTIN, L. A. et al. The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in bionanotechnology, therapy, and drug delivery. **Archives of Toxicology**, v. 88, p. 1391–1417, 2014.

[52] KHAN, M. S.; VISHAKANTE, G. D.; SIDDARAMAIAH, H. Gold nanoparticles: a paradigm shift in biomedical applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 199–200, p. 44–58, 2013.

[53] WANG, Y. et al. Simple synthesis of silver nanoparticles functionalized cuprous oxide nanowires nanocomposites and its application in electrochemical immunosensor. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 236, p. 241–248, 2016.

[54] WANG, Y. et al. Ultrasensitive label-free electrochemical immunosensor based on multifunctionalized graphene nanocomposites for the detection of alpha fetoprotein. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–10, 2017.

[55] RICCI, F.; ADORNETTO, G.; PALLESCHI, G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 74–83, 2012.

[56] OLIVEIRA, N. et al. Label-free voltammetric immunosensor for prostate specific antigen detection. **Electroanalysis**, v. 30, p. 2604–2611, 2018.

[57] THANGAMUTHU, M.; SANTACHI, C.; MARTIN, O. J. F. Label-free electrochemical immunoassay for C-reactive protein. **Biosensors**, v. 8, p. 1–11, 2018.

[58] DIBA, F. S.; KIM, S.; LEE, H. J. Electrochemical immunoassay for amyloid-beta 1–42 peptide in biological fluids interfacing with a gold nanoparticle modified carbon surface. **Catalysis Today**, p. 1–7, 2017.

[59] EISSA, S. et al. Multiplexed detection of DOCK8, PGM3 and STAT3 proteins for the diagnosis of Hyper-Immunoglobulin E syndrome using gold nanoparticles-based immunosensor array platform. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 117, p. 613–619, 2018.

[60] CHEN, L. et al. A novel label-free electrochemical immunosensor modified by glutathione and hyaluronic acid for the ultrasensitive and ultraspecific detection of brucellosis in dilute serum. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 287, p. 510–516, 2019.

[61] SHAIKH, M. O. et al. Electrochemical immunosensor utilizing electrodeposited Au nanocrystals and dielectrophoretically trapped PS/Ag/ab-HSA nanoprobe for detection of microalbuminuria at point of care. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, p. 572–580, 2019.

- [62] REIS, R. C. et al. Síndrome de Jó ou hiperimunoglobulinemia E. **Jornal de Pneumologia**, v. 27, p. 115–118, 2001.
- [63] SINGH, V. et al. DNA immobilization, delivery and cleavage on solid supports. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, p. 10602–10618, 2011.
- [64] VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 4th. ed. New York: John Wiley & Sons, 2011.
- [65] WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. A structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, p. 737–738, 1953.
- [66] WU, L.; PENG, M. An electrochemical DNA sensor for ultrasensitive detection of ARID1a targeting PD-1 checkpoint inhibitor immunological response. **Analytical Methods**, v. 11, p. 2996–3005, 2019.
- [67] RASHID, J. I. A.; YUSOF, N. A. The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: a review. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 16, p. 19–31, 2017.
- [68] PIVIDORI, M. I.; ALEGRET, S. DNA adsorption on carbonaceous materials. In: WITTMANN, C. (Ed.). **Immobilisation of DNA on Chips I**. Berlin: Springer, 2005. p. 1–37.
- [69] LABUDA, J. Terminology related to electrochemical DNA-based biosensors. In: OZSOZ, M. (Ed.). **Electrochemical DNA Biosensors**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 2012. p. 1–27.
- [70] NEGAHDARY, M.; HELI, H. An ultrasensitive electrochemical aptasensor for early diagnosis of Alzheimer's disease, using a fern leaves-like gold nanostructure. **Talanta**, v. 198, p. 510–517, 2019.
- [71] LIANG, S. et al. Measuring luteinising hormone pulsatility with a robotic aptamer-enabled electrochemical reader. **Nature Communications**, v. 10, p. 1–10, 2019.
- [72] GRABOWSKA, I. et al. Electrochemical Aptamer-Based Biosensors for the Detection of Cardiac Biomarkers. **ACS Omega**, v. 3, p. 12010–12018, 2018.
- [73] ADEEL, M.; RAHMAN, M.; LEE, J. Biosensors and Bioelectronics Label-free aptasensor for the detection of cardiac biomarker myoglobin based on gold nanoparticles decorated boron nitride nanosheets. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, p. 143–150, 2019.
- [74] STEINMETZ, M. et al. A sensitive label-free impedimetric DNA biosensor based on silsesquioxane-functionalized gold nanoparticles for Zika Virus detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 141, p. 111351, 2019.
- [75] ILKHANI, H.; FARHAD, S. A novel electrochemical DNA biosensor for Ebola virus detection. **Analytical Biochemistry**, v. 557, p. 151–155, 2018.
- [76] LU, H. et al. Voltammetric determination of the Alzheimer's disease-related ApoE 4 gene from unamplified genomic DNA extracts by ferrocene-capped gold nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 185, p. 1–7, 2018.
- [77] GONG, Q. et al. Sensitive electrochemical DNA sensor for the detection of HIV based on a polyaniline/graphene nanocomposite. **Journal of Materiomics**, v. 5, p. 313–319, 2019.
- [78] BIZID, S. et al. Direct E-DNA sensor of Mycobacterium tuberculosis mutant strain based

on new nanocomposite transducer (Fc-ac-OMPA/MWCNTs). **Talanta**, v. 184, p. 475–483, 2018.

[79] BIAŁOBRZESKA, W. et al. Analysis of interactions between calf thymus DNA and 1,5-di(piperazin-1-yl)anthracene-9,10-dione using spectroscopic and electrochemical methods. **Journal of Molecular Liquids**, v. 289, p. 1–7, 2019.

[80] MUTI, M.; MUTI, M. Electrochemical monitoring of the interaction between anticancer drug and DNA in the presence of antioxidant. **Talanta**, v. 178, p. 1033–1039, 2018.

[81] DAI, Y. et al. Nanoparticle based simple electrochemical biosensor platform for profiling of protein-nucleic acid interactions. **Talanta**, v. 195, p. 46–54, 2019.

[82] MACHINI, W. B. S.; MARQUES, N. V.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. In Situ Evaluation of Anticancer Monoclonal Antibody Nivolumab-DNA Interaction Using a DNA-Electrochemical Biosensor. **ChemElectroChem**, v. 6, p. 4608–4616, 2019.

[83] SODA, N.; AROTIBA, O. A. A polyamidoamine dendrimer-streptavidin supramolecular architecture for biosensor development. **Bioelectrochemistry**, v. 118, p. 14–18, 2017.

[84] CONGUR, G.; EKSIN, E.; ERDEM, A. Chitosan modified graphite electrodes developed for electrochemical monitoring of interaction between daunorubicin and DNA. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 22, p. 100255, 2019.

[85] KURALAY, F.; DÜKAR, N.; BAYRAMLI, Y. Poly-L-lysine coated surfaces for ultrasensitive nucleic acid detection. **Electroanalysis**, v. 30, p. 1556–1565, 2018.

[86] TRAN, T. L. et al. In-channel-grown polypyrrole nanowire for the detection of DNA hybridization in an electrochemical microfluidic biosensor. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, p. 1–7, 2015.

[87] STEPANOVA, V. et al. DNA-poly lactide modified biosensor for electrochemical determination of the DNA-drugs and aptamer-aflatoxin M1 interactions. **Sensors**, v. 19, p. 4962, 2019.

[88] ASAI, K. et al. An electrochemical aptamer-based sensor prepared by utilizing the strong interaction between a DNA and diamond. **Analyst**, v. 145, p. 544–549, 2020.

[89] RASHID, J. I. A.; YUSOF, N. A. The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 16, p. 19–31, 2017.

[90] YE, Y. et al. Electrochemical gene sensor based on a glassy carbon electrode modified with hemin-functionalized reduced graphene oxide and gold nanoparticle-immobilized probe DNA. **Microchimica Acta**, v. 184, p. 245–252, 2017.

[91] SÁNCHEZ-PANIAGUA, M. et al. Electrochemical genosensor for Klotho detection based on aliphatic and aromatic thiols self-assembled monolayers. **Talanta**, v. 212, p. 120735, 2020.

[92] QI, L.; TIAN, H.; YU, H. Z. Binary thiolate DNA/ferrocenyl self-assembled monolayers on gold: a versatile platform for probing biosensing interfaces. **Analytical Chemistry**, v. 90, p. 9174–9181, 2018.

[93] MANZANO, M. et al. Rapid and label-free electrochemical DNA biosensor for detecting

hepatitis A virus. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 100, p. 89–95, 2018.

[94] ZHANG, J. et al. A gold nanoparticle-based chronocoulometric DNA sensor for amplified detection of DNA. **Nature Protocols**, v. 2, p. 2888–2895, 2007.

[95] KEIGHLEY, S. D. et al. Optimization of DNA immobilization on gold electrodes for label-free detection by electrochemical impedance spectroscopy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p. 1291–1297, 2008.

[96] HENRY, O. Y. F. et al. Electrochemical characterisation and hybridisation efficiency of co-assembled monolayers of PEGylated ssDNA and mercaptohexanol on planar gold electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 978–983, 2010.

[97] RASHEED, P. A.; SANDHYARANI, N. Electrochemical DNA sensors based on the use of gold nanoparticles: a review on recent developments. **Microchimica Acta**, v. 184, p. 981–1000, 2017.

[98] ZHAI, S. et al. A label-free genetic biosensor for diabetes based on AuNPs decorated ITO with electrochemiluminescent signaling. **Analytica Chimica Acta**, v. 982, p. 62–71, 2017.

[99] ZHANG, L. et al. Hybridization performance of DNA/mercaptohexanol mixed monolayers on electrodeposited nanoAu and rough Au surfaces. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 757, p. 203–209, 2015.

[100] CARR, O. et al. Genosensor made with a self-assembled monolayer matrix to detect MGMT gene methylation in head and neck cancer cell lines. **Talanta**, v. 210, p. 120609, 2020.

[101] WEBER, P. C. et al. Structural Origins of high-affinity biotin binding. **Science**, v. 243, p. 85–88, 1988.

[102] HENDRICKSON, W. A. et al. Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 2190–2194, 1989.

[103] CHIVERS, C. E. et al. How the biotin-streptavidin interaction was made even stronger: Investigation via crystallography and a chimaeric tetramer. **Biochemical Journal**, v. 435, p. 55–63, 2011.

[104] LI, Q. et al. A novel DNA biosensor integrated with Polypyrrole/streptavidin and Au-PAMAM-CP bionanocomposite probes to detect the rs4839469 locus of the vangl1 gene for dysontogenesis prediction. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 674–681, 2016.

[105] BARTOLOME, J. P.; ECHEGOYEN, L.; FRAGOSO, A. Reactive Carbon Nano-Onion Modified Glassy Carbon Surfaces as DNA Sensors for Human Papillomavirus Oncogene Detection with Enhanced Sensitivity. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 6744–6751, 2015.

[106] SHOAIE, N.; FOROUZANDEH, M.; OMIDFAR, K. Voltammetric determination of the Escherichia coli DNA using a screen-printed carbon electrode modified with polyaniline and gold nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 185, p. 217, 2018.

[107] TAKAHAMA, K. et al. Article regulation of telomere length. **Chemistry & Biology**, v. 20, p. 341–350, 2013.

[108] INABA, S. et al. Thermodynamic effects of multiple protein conformations on stability

and DNA binding. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 537, p. 225–232, 2013.

[109] BRAZDOVA, M. et al. p53 Specifically Binds Triplex DNA In Vitro and in Cells. **PLoS ONE**, v. 11, p. e0167439, 2016.

[110] PILLET, F. et al. Dendrimer functionalization of gold surface improves the measurement of protein-DNA interactions by surface plasmon resonance imaging. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 43, p. 148–154, 2013.

[111] ZANDARASHVILI, L. et al. Entropic enhancement of protein-DNA affinity by oxygen-to-sulfur substitution in DNA phosphate. **Biophysical Journal**, v. 109, p. 1026–1037, 2015.

[112] MURPHY, M. W. et al. An ancient protein-DNA interaction underlying metazoan sex determination. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 22, p. 442–451, 2015.

[113] TERSCH, C.; LISDAT, F. Label-free detection of protein-DNA interactions using electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 7673–7679, 2011.

[114] DICULESCU, V. C.; CHIORCEA-PAQUIM, A. M.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Applications of a DNA-electrochemical biosensor. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 23–36, 2016.

[115] SUN, K. et al. Aptasensors for the selective detection of alpha-synuclein oligomer by colorimetry, surface plasmon resonance and electrochemical impedance spectroscopy. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 245, p. 87–94, 2017.

[116] OSTATNÁ, V. et al. Chronopotentiometric sensing of specific interactions between lysozyme and the DNA aptamer. **Bioelectrochemistry**, v. 114, p. 42–47, 2017.

[117] MACAZO, F. C.; KARPEL, R. L.; WHITE, R. J. Monitoring cooperative binding using electrochemical DNA-based sensors. **Langmuir**, v. 31, p. 868–875, 2015.

[118] XU, J. et al. A protein-based electrochemical method for label-free characterization of sequence-specific protein-DNA interactions. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 5759–5765, 2011.

[119] LI, C. et al. In vitro analysis of DNA-protein interactions in gene transcription using DNAzyme-based electrochemical assay. **Analytical Chemistry**, v. 89, p. 5003–5007, 2017.

[120] RONCHI, C. L. et al. EJE Prize 2014: Current and evolving treatment options in adrenocortical carcinoma: where do we stand and where do we want to go ? **European Society of Endocrinology**, v. 171, p. R1–R11, 2014.

[121] KEMPNÁ, P.; FLÜCK, C. E. Adrenal gland development and defects. **Best Practice & Research in Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 77–93, 2008.

[122] ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histology: a text and atlas**. 6th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011.

[123] LALLI, E.; FIGUEIREDO, B. C. Pediatric adrenocortical tumors : what they can tell us on adrenal development and comparison with adult adrenal tumors. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, p. 1–9, 2015.

[124] **Adrenal Gland Vein Sampling**. Disponível em: <<https://atlantavascularandveincenters.com/adrenal-vein-sampling/>>. Acesso em: 31 oct. 2019.

- [125] **The Endocrine Organs - Adrenal Glands.** Disponível em: <<http://www.cram.com/flashcards/the-endocrine-organs-adrenal-glands-6136487>>. Acesso em: 31 oct. 2019.
- [126] AUFFORTH, R. D.; NILUBOL, N. Emerging therapy for adrenocortical carcinoma. **International Journal of Endocrine Oncology**, v. 1, p. 173–182, 2014.
- [127] CTVRTLÍK, F.; KORANDA, P.; TICHÝ, T. Adrenal disease: a clinical update and overview of imaging . A review. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky**, v. 158, p. 23–34, 2014.
- [128] PRZYTUŁSKA, J.; ROGALA, N.; BEDNAREK-TUPIKOWSKA, G. Current and emerging therapies for adrenocortical carcinoma - Review. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 24, p. 185–193, 2015.
- [129] ELSE, T. et al. Adrenocortical Carcinoma. **Endocrine Reviews**, v. 35, p. 282–326, 2014.
- [130] XU, X.; SERGI, C. Pediatric adrenal cortical carcinoma: Histopathological criteria and clinical trials. A systematic review. **Contemporary Clinical Trials**, v. 50, p. 37–44, 2016.
- [131] MAHENDRARAJ, K. et al. Adrenocortical carcinoma in adults and children: a population-based outcomes study involving 1,623 patients from the surveillance, epidemiology, and end result (SEER) database (1973-2012). **Clinics in Surgery**, v. 1, p. 1–7, 2016.
- [132] FETT-CONTE, A. C.; SALLES, A. B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, p. 85–89, 2002.
- [133] PATEL, V. V. et al. Giant non-functioning adrenocortical carcinoma: a rare childhood tumor. **Indian Journal of Medical and Pediatric Oncology**, v. 31, p. 65–69, 2010.
- [134] ERICKSON, L. A.; RIVERA, M.; ZHANG, J. Adrenocortical Carcinoma: Review and Update. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 21, p. 151–159, 2014.
- [135] ALLOLIO, B.; FASSNACHT, M. CLINICAL REVIEW: Adrenocortical Carcinoma: Clinical Update. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, p. 2027–2037, 2006.
- [136] FAY, A. P. et al. Adrenocortical carcinoma: the management of metastatic disease. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 92, p. 123–132, 2014.
- [137] AYALA-RAMIREZ, M. et al. Adrenocortical carcinoma: clinical outcomes and prognosis of 330 patients at a tertiary care Center. **European Journal of Endocrinology**, v. 169, p. 891–899, 2013.
- [138] CUSTÓDIO, G. et al. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, p. 2619–2626, 2013.
- [139] COSTA, T. E. J. et al. Penetrance of the TP53 R337H mutation and pediatric adrenocortical carcinoma incidence associated with environmental influences in a 12-year observational cohort in Southern Brazil. **Cancers**, v. 11, p. 1–16, 2019.
- [140] MO, Q.; LU, S.; SIMON, N. G. Dehydroepiandrosterone and its metabolites: differential effects on androgen receptor trafficking and transcriptional activity. **Journal of Steroid**

Biochemistry and Molecular Biology, v. 99, p. 50–58, 2006.

[141] HARRIS, P. E.; BOULOUX, P.-M. G. **Endocrinology: in Clinical Practice**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2014.

[142] PROUGH, R. A.; CLARK, B. J.; KLINGE, C. M. Novel mechanisms for DHEA action. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 56, p. R139–R155, 2016.

[143] BECKER, K. L. (ED.). **Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

[144] MENDONÇA, B. B. et al. Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. **The Journal of Urology**, v. 154, p. 2004–2009, 1995.

[145] PEREIRA, R. M. et al. Tumores do córtex adrenal na infância. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, p. 651–658, 2004.

[146] TERZOLO, M. et al. The value of dehydroepiandrosterone sulfate measurement in the differentiation between benign and malignant adrenal masses. **European Journal of Endocrinology**, v. 142, p. 611–617, 2000.

[147] WAGGONER, W.; BOOTS, L. R.; AZZIZ, R. Total testosterone and DHEAS levels as predictors of androgen-secreting neoplasms: a populational study. **Gynecological Endocrinology**, v. 13, p. 394–400, 1999.

[148] STIGLIANO, A. et al. New insights and future perspectives in the therapeutic strategy of adrenocortical carcinoma (Review). **Oncology Reports**, v. 37, p. 1301–1311, 2017.

[149] KLEIN, J. D. et al. Adrenal cortical tumors in children: factors associated with poor outcome. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 46, p. 1201–1207, 2011.

[150] CAO, Z. (TIM) et al. Noninvasive determination of human cortisol and dehydroepiandrosterone sulfate using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, p. 1203–1210, 2019.

[151] OLISOV, D. et al. Measurement of serum steroid profiles by HPLC-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1117, p. 1–9, 2019.

[152] FANELLI, F.; DALMAZI, G. DI. Serum steroid profiling by mass spectrometry in adrenocortical tumors: diagnostic implications. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity**, v. 26, p. 160–165, 2019.

[153] VELIKANOVA, L. I. et al. Different Types of Urinary Steroid Profiling Obtained by High-Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Patients with Adrenocortical Carcinoma. **Hormones and Cancer**, v. 7, p. 327–335, 2016.

[154] SHAFIGULLINA, Z. R. et al. Urinary steroid profiling by gas chromatography mass spectrometry: Early features of malignancy in patients with adrenal incidentalomas. **Steroids**, v. 135, p. 31–35, 2018.

[155] ROBLES, J. et al. Quantifying endogenous androgens, estrogens, pregnenolone and progesterone metabolites in human urine by gas chromatography tandem mass spectrometry.

Talanta, v. 169, p. 20–29, 2017.

[156] SHRIVASTAV, T. G. et al. Influence of different homologous and heterologous combinations of antibodies and enzyme conjugates of dehydroepiandrosterone on the sensitivity and specificity of DHEA ELISA. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 32, p. 114–127, 2011.

[157] SHRIVASTAV, T. G. et al. Antigen heterologous enzyme linked immunosorbent assay for the measurement of dhe in serum. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 32, p. 326–341, 2011.

[158] WHETZEL, C. A.; KLEIN, L. C. Measuring DHEA-S in saliva: Time of day differences and positive correlations between two different types of collection methods. **BMC Research Notes**, v. 3, p. 1–5, 2010.

[159] TOPOR, L. S. et al. Cortisol stimulates secretion of dehydroepiandrosterone in human adrenocortical cells through inhibition of 3 β HSD2. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, p. 31–39, 2011.

[160] WANG, C. et al. An aptameric graphene nanosensor for label-free detection of small-molecule biomarkers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 71, p. 222–229, 2015.

[161] BALABAN, S. et al. An electrochemical biosensor platform for testing of dehydroepiandrosterone 3-sulfate (DHEA-S) as a model for doping materials. **Electroanalysis**, v. 31, p. 1–8, 2019.

[162] LIMA, D. et al. Label-free impedimetric immunosensor based on arginine-functionalized gold nanoparticles for detection of DHEAS , a biomarker of pediatric adrenocortical carcinoma. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 133, p. 86–93, 2019.

[163] FOGAÇA, R. L. et al. Biomolecular engineering of antidehydroepiandrosterone antibodies: a new perspective in cancer diagnosis and treatment using single-chain antibody variable fragment. **Nanomedicine**, v. 14, p. 689–705, 2019.

[164] KUMAR, N.; SHEO, L.; UPADHYAY, B. Facile and green synthesis of highly stable l -cysteine functionalized copper nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 385, p. 225–233, 2016.

[165] **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.** Ministério da Saúde: Brasil, , 2003.

[166] **International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1).** , 2005.

[167] PATTABIRAMAN, V. R.; BODE, J. W. Rethinking amide bond synthesis. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 471–479, 2011.

[168] SABATINI, M. T. et al. Protecting-Group-Free Amidation of Amino Acids using Lewis Acid Catalysts. **Chemistry - A European Journal**, v. 24, p. 7033–7043, 2018.

[169] PEIXOTO, A. M. et al. **Enciclopédia Agrícola Brasileira.** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002.

[170] NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica.** 3ª ed. São Paulo:

Sarvier, 2002.

[171] ZARE, D. et al. L-arginine and L-glutamic acid capped gold nanoparticles at physiological pH: synthesis and characterization using agarose gel electrophoresis. **Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry**, v. 42, p. 266–272, 2012.

[172] RAMEZANI, F.; AMANLOU, M.; RAFII-TABAR, H. Comparison of amino acids interaction with gold nanoparticle. **Amino Acids**, v. 46, p. 911–920, 2014.

[173] GLIŠIĆ, B. Đ.; RYCHLEWSKA, U.; DJURAN, M. I. Reactions and structural characterization of gold(III) complexes with amino acids, peptides and proteins. **Dalton Transactions**, v. 41, p. 6887–6901, 2012.

[174] LIANG, X.; WANG, Z. JUN; LIU, C. JUN. Size-controlled synthesis of colloidal gold nanoparticles at room temperature under the influence of glow discharge. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, p. 124–129, 2010.

[175] FONG, K. E.; YUNG, L. Y. L. Localized surface plasmon resonance: A unique property of plasmonic nanoparticles for nucleic acid detection. **Nanoscale**, v. 5, p. 12043–12071, 2013.

[176] HUANG, X.; EL-SAYED, M. A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. **Journal of Advanced Research**, v. 1, p. 13–28, 2010.

[177] NIESEN, B. et al. Excitation of multiple dipole surface plasmon resonances in spherical silver nanoparticles. **Optics Express**, v. 18, p. 19032–19038, 2010.

[178] PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; BADERTSCHER, M. **Struture Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data**. 4th. ed. Berlin: Springer, 2009.

[179] ARYAL, S. et al. Spectroscopic identification of S- Au interaction in cysteine capped gold nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 63, p. 160–163, 2006.

[180] PU, W. et al. Visual detection of arginine based on the unique guanidino group-induced aggregation of gold nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**, v. 764, p. 78–83, 2013.

[181] **Zetasizer Nano Series User Manual**. Disponível em: <[www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern Zetasizer ZS DLS user manual.pdf](http://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DLS%20user%20manual.pdf)>. Acesso em: 1 nov. 2019.

[182] ŠEGOTA, S.; HEIMER, S.; TEŽAK, ĐURDICA. New catanionic mixtures of dodecyldimethylammonium bromide/sodium dodecylbenzenesulphonate/water I. Surface properties of dispersed particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 274, p. 91–99, 2006.

[183] LIM, J. et al. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, p. 1–14, 2013.

[184] HOLDER, C. F.; SCHAAK, R. E. Tutorial on powder X-ray diffraction for characterizing nanoscale materials. **ACS Nano**, v. 13, p. 7359–7365, 2019.

[185] **RRUFF - Gold R070279**. Disponível em: <<http://rruff.info/gold/display=default/>>. Acesso em: 7 nov. 2019.

- [186] BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.
- [187] BARBERO, C.; KÖTZ, R. Electrochemical Activation of Glassy Carbon. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 140, p. 1–6, 1993.
- [188] JAROCKA, U. et al. Electrochemical immunosensor for detection of antibodies against influenza A virus H5N1 in hen serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 55, p. 301–306, 2014.
- [189] GHONIM, A. M.; EL-ANADOULI, B. E.; SALEH, M. M. Electrocatalytic glucose oxidation on electrochemically oxidized glassy carbon modified with nickel oxide nanoparticles. **Electrochimica Acta**, v. 114, p. 713–719, 2013.
- [190] DEKANSKI, A. et al. Glassy carbon electrodes I. Characterization and electrochemical activation. **Carbon**, v. 39, p. 1195–1205, 2001.
- [191] WANG, C. et al. Different EDC/NHS activation mechanisms between PAA and PMAA brushes and the following amidation reactions. **Langmuir**, v. 27, p. 12058–12068, 2011.
- [192] SILVA, B. V. M. et al. A carbon nanotube screen-printed electrode for label-free detection of the human cardiac troponin T. **Talanta**, v. 117, p. 431–437, 2013.
- [193] BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: Avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, parte III. **Química Nova**, v. 37, p. 564–573, 2014.
- [194] MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 8th. ed. New York: John Wiley & Sons, 2013.
- [195] LUNDSTEDT, T. et al. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, p. 3–40, 1998.
- [196] CEGLAREK, U. et al. Rapid quantification of steroid patterns in human serum by on-line solid phase extraction combined with liquid chromatography-triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**, v. 401, p. 114–118, 2009.
- [197] KATAYAMA, M. et al. Simultaneous determination of 16 estrogens, dehydroepiandrosterone and their glucuronide and sulfate conjugates in serum using sodium cholate micelle capillary electrophoresis. **Biomedical Chromatography**, v. 17, p. 263–267, 2003.
- [198] CHADWICK, C. A.; OWEN, L. J.; KEEVIL, B. G. Development of a method for the measurement of dehydroepiandrosterone sulphate by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 42, p. 468–474, 2005.
- [199] LEWIS, J. G.; BASON, L. M.; ELDER, P. A. Production and characterization of monoclonal antibodies to dehydroepiandrosterone sulfate: application to direct enzyme-linked immunosorbent assays of dehydroepiandrosterone sulfate and androsterone/epiandrosterone sulfates in plasma. **Steroids**, v. 61, p. 682–687, 1996.
- [200] AMATO, M. C. et al. Visceral adiposity index and DHEAS are useful markers of diabetes risk in women with polycystic ovary syndrome. **European Journal of Endocrinology**, v. 172,

p. 79–88, 2015.

[201] LENNARTSSON, A. K. et al. DHEA and DHEA-S response to acute psychosocial stress in healthy men and women. **Biological Psychology**, v. 90, p. 143–149, 2012.

[202] SEVERSON, A.; BARCLAY, R. S. **Testosterone levels by age**. Disponível em: <<http://www.healthline.com/health/low?testosterone/testosterone?levels?by?age?print=true>>. Acesso em: 8 nov. 2016.

[203] SIPPELL, W. G. et al. Plasma levels of aldosterone, corticosterone, 11-deoxycorticosterone, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, cortisol, and cortisone during infancy and childhood. **Pediatric Research**, v. 46, p. 39–46, 1980.

[204] AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Cholesterol in childhood. **Pediatrics**, v. 101, p. 141–147, 1998.

[205] SHAH, V. P. et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, p. 309–312, 1992.

[206] LIU, C. C. et al. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, p. 106–118, 2013.

[207] **World Health Organization. Dementia**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>. Acesso em: 24 dec. 2019.

[208] STELZMANN, R. A.; SCHNITZLEIN, N.; MURTAGH, F. R. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." **Clinical Anatomy**, v. 8, p. 429–431, 1995.

[209] 2019 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 15, p. 321–387, 2019.

[210] Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, p. 1789–1858, 2018.

[211] MENDEZ, M. F. Early-onset Alzheimer's disease: nonamnestic subtypes and type 2 AD. **Archives of Medical Research**, v. 43, p. 677–685, 2012.

[212] MENDIOLA-PRECOMA, J. et al. Therapies for prevention and treatment of Alzheimer's disease. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–17, 2016.

[213] MONTOLIU-GAYA, L.; VILLEGAS, S. Aβ-immunotherapeutic strategies: a wide range of approaches for Alzheimer's disease treatment. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 18, p. 1–15, 2016.

[214] DYCK, C. H. VAN. Anti-Amyloid-β Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: Pitfalls and Promise. **Biological Psychiatry**, v. 83, p. 311–319, 2018.

[215] MARCIANI, D. J. Promising Results from Alzheimer's Disease Passive Immunotherapy Support the Development of a Preventive Vaccine. **Research**, v. 2019, p. 1–14, 2019.

[216] LOURENCO, M. V. et al. Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models. **Nature Medicine**, v. 25, p. 165–175, 2019.

- [217] PACIOTTI, S. et al. Diagnostic performance of a fully automated chemiluminescent enzyme immunoassay for Alzheimer's disease diagnosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 494, p. 74–78, 2019.
- [218] PÉREZ-RUIZ, E. et al. Digital ELISA for the quantification of attomolar concentrations of Alzheimer's disease biomarker protein Tau in biological samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 1015, p. 74–81, 2018.
- [219] MURAKAMI, K. et al. Monoclonal antibody with conformational specificity for a toxic conformer of amyloid β 42 and its application toward the Alzheimer's disease diagnosis. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–12, 2016.
- [220] HWANG, S. S. et al. Detection of amyloid β oligomers toward early diagnosis of Alzheimer's disease. **Analytical Biochemistry**, v. 566, p. 40–45, 2019.
- [221] LISI, S. et al. Toward sensitive immuno-based detection of tau protein by surface plasmon resonance coupled to carbon nanostructures as signal amplifiers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 93, p. 289–292, 2017.
- [222] LI, S. S. et al. Non-invasive screening for early Alzheimer's disease diagnosis by a sensitively immunomagnetic biosensor. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–11, 2016.
- [223] QIN, J. et al. Curcumin-based electrochemical sensor of amyloid-B oligomer for the early detection of Alzheimer's disease. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 273, p. 1593–1599, 2018.
- [224] LIU, M. et al. Multi-modality cascaded convolutional neural networks for Alzheimer's disease diagnosis. **Neuroinformatics**, v. 16, p. 295–308, 2018.
- [225] DETURE, M. A.; DICKSON, D. W. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 14, p. 32, 2019.
- [226] HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, v. 256, p. 184–185, 1992.
- [227] PANZA, F. et al. A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, p. 73–88, 2019.
- [228] KANT, R. VAN DER; GOLDSTEIN, L. S. B. Cellular Functions of the Amyloid Precursor Protein from Development to Dementia. **Developmental Cell**, v. 32, p. 502–515, 2015.
- [229] MÜLLER, U. C.; DELLER, T.; KORTE, M. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, p. 281–298, 2017.
- [230] POLANCO, J. C. et al. Amyloid- β and tau complexity - towards improved biomarkers and targeted therapies. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, p. 22–40, 2018.
- [231] O'BRIEN, R. J.; WONG, P. C. Amyloid precursor protein processing in Alzheimer's disease. **Annual Review of Neuroscience**, v. 34, p. 185–204, 2011.
- [232] ZHANG, X. et al. The early events that initiate β -amyloid aggregation in Alzheimer's disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 10, p. 1–13, 2018.

- [233] YAMAZAKI, Y. et al. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, p. 501–518, 2019.
- [234] KANEKIYO, T.; XU, H.; BU, G. ApoE and A β in Alzheimer's disease: Accidental encounters or partners? **Neuron**, v. 81, p. 740–754, 2014.
- [235] FINDER, V. H.; GLOCKSHUBER, R. Amyloid- β aggregation. **Neurodegenerative Diseases**, v. 4, p. 13–27, 2007.
- [236] QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, p. 329–344, 2010.
- [237] MANDELKOW, E. M.; MANDELKOW, E. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, p. 1–25, 2012.
- [238] ALI, Y.; RUAN, K.; GRACE ZHAI, R. Drosophila Models of Tauopathy. In: LEDOUX, M. (Ed.). . **Movement Disorders: Genetics and Models**. 2nd. ed. New York: Elsevier Inc., 2015. p. 829–848.
- [239] HERVY, J.; BICOUT, D. J. Dynamical decoration of stabilized-microtubules by Tau-proteins. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1–15, 2019.
- [240] TRUSHINA, N. I. et al. The evolution of Tau phosphorylation and interactions. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 11, p. 1–18, 2019.
- [241] LUCKE-WOLD, B. P. et al. Linking traumatic brain injury to chronic traumatic encephalopathy: identification of potential mechanisms leading to neurofibrillary tangle development. **Journal of Neurotrauma**, v. 31, p. 1129–1138, 2014.
- [242] KOLAROVA, M. et al. Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2012, p. 1–13, 2012.
- [243] WEYDT, P.; DUPUIS, L.; PETERSEN, Å. Thermoregulatory disorders in Huntington disease. In: ROMANOVSKY, A. A. (Ed.). . **Handbook of Clinical Neurology. Thermoregulation: from Basic Neuroscience to Clinical Neurology, Part II**. Amsterdam: Elsevier B.V., 2018. v. 157p. 761–775.
- [244] BARBIER, P. et al. Role of Tau as a microtubule-associated protein: structural and functional aspects. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 11, p. 1–14, 2019.
- [245] CHEN, S. et al. Advances with RNA interference in Alzheimer's disease research. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 7, p. 117–125, 2013.
- [246] VERGHESE, P.; CASTELLANO, J.; HOLTZMAN, D. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. **The Lancet Neurology**, v. 10, p. 241–252, 2011.
- [247] RIEDEL, B. C.; THOMPSON, P. M.; BRINTON, R. D. Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 160, p. 134–147, 2016.
- [248] PHILLIPS, M. C. Apolipoprotein e isoforms and lipoprotein metabolism. **IUBMB Life**, v. 66, p. 616–623, 2014.
- [249] HATTERS, D. M.; PETERS-LIBEU, C. A.; WEISGRABER, K. H. Apolipoprotein E

structure: insights into function. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, p. 445–454, 2006.

[250] FARRER, L. A. et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. **Journal of the American Medical Association**, v. 278, p. 1349–56, 1997.

[251] HUANG, Y.; MAHLEY, R. W. Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 72, p. 3–12, 2014.

[252] ZHAO, N. et al. Apolipoprotein E, receptors, and modulation of Alzheimer's disease. **Biological Psychiatry**, v. 83, p. 347–357, 2018.

[253] SCHMECHEL, D. E. et al. Increased amyloid, 8-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease (phenotype/APOE4 gene). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 9649–9653, 1993.

[254] KOK, E. et al. Apolipoprotein E-dependent accumulation of alzheimer disease-related lesions begins in middle age. **Annals of Neurology**, v. 65, p. 650–657, 2009.

[255] YU, L. et al. APOE and cerebral amyloid angiopathy in community-dwelling older persons. **Neurobiology of Aging**, v. 36, p. 2946–2953, 2015.

[256] DEROO, S. et al. Chemical cross-linking mass spectrometry maps the amyloid β peptide binding region on both ApoE domains. **ACS Chemical Biology**, v. 10, p. 1010–1016, 2015.

[257] BILOUSOVA, T. et al. Apolipoprotein E/Amyloid- β complex accumulates in Alzheimer disease cortical synapses via apolipoprotein E receptors and is enhanced by APOE4. **American Journal of Pathology**, v. 189, p. 1621–1636, 2019.

[258] TAI, L. M. et al. Soluble apoE A β complex mechanism and therapeutic target for APOE4 induced AD risk.pdf. **Molecular Neurodegeneration**, v. 9, p. 1–14, 2014.

[259] WADHWANI, A. R. et al. Neuronal apolipoprotein E4 increases cell death and phosphorylated tau release in alzheimer disease. **Annals of Neurology**, v. 85, p. 726–739, 2019.

[260] FARFEL, J. M. et al. Association of APOE with tau-tangle pathology with and without β -amyloid. **Neurobiology of Aging**, v. 37, p. 19–25, 2016.

[261] SHI, Y. et al. ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. **Nature**, v. 549, p. 523–527, 2017.

[262] LIRAZ, O.; BOEHM-CAGAN, A.; MICHAELSON, D. M. ApoE4 induces A β 42, tau, and neuronal pathology in the hippocampus of young targeted replacement apoE4 mice. **Molecular Neurodegeneration**, v. 8, p. 1–17, 2013.

[263] NAKAGAWA, T.; GUARENTE, L. Sirtuins at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 124, p. 833–838, 2011.

[264] RINE, J.; HERSKOWITZ, I. Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 116, p. 9–22, 1987.

[265] KAEBERLEIN, M.; MCVEY, M.; GUARENTE, L. The SIR2/3/4 complex and SIR2

alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. **Genes & Development**, v. 13, p. 2570–2580, 1999.

[266] IMAI, S. et al. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. **Nature**, v. 403, p. 795–800, 2000.

[267] WĄTROBA, M. et al. Sirtuins, epigenetics and longevity. **Ageing Research Reviews**, v. 40, p. 11–19, 2017.

[268] HOUTKOOPE, R. H.; PIRINEN, E.; AUWERX, J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 225–238, 2012.

[269] GRABOWSKA, W.; SIKORA, E.; BIELAK-ZMIJEWSKA, A. Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process. **Biogerontology**, v. 18, p. 447–476, 2017.

[270] BONKOWSKI, M. S.; SINCLAIR, D. A. Slowing ageing by design: The rise of NAD⁺ and sirtuin-activating compounds. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, p. 679–690, 2016.

[271] MIN, S. W. et al. Sirtuins in neurodegenerative diseases: an update on potential mechanisms. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 5, p. 1–9, 2013.

[272] AJAMI, M. et al. Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease and their modulation by polyphenols. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 73, p. 39–47, 2017.

[273] WONG, S. Y.; TANG, B. L. SIRT1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. **Reviews in the Neurosciences**, v. 27, p. 813–825, 2016.

[274] HERSKOVITS, A. Z.; GUARENTE, L. Sirtuin deacetylases in neurodegenerative diseases of aging. **Cell Research**, v. 23, p. 746–758, 2013.

[275] NG, F.; WIJAYA, L.; TANG, B. L. SIRT1 in the brain - connections with aging-associated disorders and lifespan. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, p. 1–13, 2015.

[276] LALLA, R.; DONMEZ, G. The role of sirtuins in Alzheimer's disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 5, p. 1–4, 2013.

[277] JULIEN, C. et al. Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of Tau in Alzheimer Disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 68, p. 48–58, 2009.

[278] CORPAS, R. et al. SIRT1 overexpression in mouse hippocampus induces cognitive enhancement through proteostatic and neurotrophic mechanisms. **Molecular Neurobiology**, v. 54, p. 5604–5619, 2017.

[279] DONMEZ, G. The effects of SIRT1 on Alzheimer's disease models. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2012, p. 1–3, 2012.

[280] FUTCH, H. S.; CROFT, C. L. SIRT1: A novel way to target Tau? **Journal of Neuroscience**, v. 38, p. 7755–7757, 2018.

[281] LODISH, H. et al. **Molecular Cell Biology**. 5th. ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2004.

[282] MIN, S. W. et al. Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. **Neuron**, v. 67, p. 953–966, 2010.

- [283] DAVENPORT, A. M.; HUBER, F. M.; HOELZ, A. **RCSB PDB 4IG9 - Structure of NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1 (open state, 2.64 Å)**. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/structure/4IG9>>. Acesso em: 7 jan. 2020.
- [284] THEENDAKARA, V. et al. Neuroprotective Sirtuin ratio reversed by ApoE4. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 18303–18308, 2013.
- [285] THEENDAKARA, V. et al. Direct Transcriptional Effects of Apolipoprotein E. **Journal of Neuroscience**, v. 36, p. 685–700, 2016.
- [286] PARCON, P. A. et al. Apolipoprotein E4 inhibits autophagy gene products through direct, specific binding to CLEAR motifs. **Alzheimer's and Dementia**, v. 14, n. 2, p. 230–242, 2018.
- [287] POLITO, V. A. et al. Selective clearance of aberrant tau proteins and rescue of neurotoxicity by transcription factor EB. **EMBO Molecular Medicine**, v. 6, p. 1142–1160, 2014.
- [288] GIATROMANOLAKI, A. et al. Autophagy and lysosomal related protein expression patterns in human glioblastoma. **Cancer Biology & Therapy**, v. 15, p. 1468–1478, 2014.
- [289] LEIDAL, A. M.; LEVINE, B.; DEBNATH, J. Autophagy and the cell biology of age-related disease. **Nature Cell Biology**, v. 20, p. 1338–1348, 2018.
- [290] HANSEN, M.; RUBINSZTEIN, D. C.; WALKER, D. W. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, p. 579–593, 2018.
- [291] GATICA, D.; LAHIRI, V.; KLIONSKY, D. J. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. **Nature Cell Biology**, v. 20, p. 233–242, 2018.
- [292] DOHERTY, J.; BAEHRECKE, E. H. Life, death and autophagy. **Nature Cell Biology**, v. 20, p. 1110–1117, 2018.
- [293] NIXON, R. A. et al. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: An immuno-electron microscopy study. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 64, p. 113–122, 2005.
- [294] LEE, M. J.; LEE, J. H.; RUBINSZTEIN, D. C. Tau degradation: The ubiquitin-proteasome system versus the autophagy-lysosome system. **Progress in Neurobiology**, v. 105, p. 49–59, 2013.
- [295] BORDI, M. et al. Autophagy flux in CA1 neurons of Alzheimer hippocampus: Increased induction overburdens failing lysosomes to propel neuritic dystrophy. **Autophagy**, v. 12, p. 2467–2483, 2016.
- [296] LEE, J. H. et al. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. **Cell**, v. 141, p. 1146–1158, 2010.
- [297] PALMIERI, M. et al. Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 19, p. 3852–3866, 2011.
- [298] SARDIELLO, M. et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. **Science**, v. 325, p. 473–477, 2009.

- [299] LIMA, D. et al. Electrochemical detection of specific interaction between apolipoprotein E isoforms and DNA sequences related to Alzheimer's disease. **Bioelectrochemistry**, v. 133, p. 107447, 2020.
- [300] VELOSO, A. J. et al. Electrochemical Immunosensors for Effective Evaluation of Amyloid- β Modulators on Oligomeric and Fibrillar Aggregation Processes. **Analytical Biochemistry**, v. 86, p. 4901–4909, 2014.
- [301] MCEWEN, G. D.; CHEN, F.; ZHOU, A. Immobilization, hybridization, and oxidation of synthetic DNA on gold surface: Electron transfer investigated by electrochemistry and scanning tunneling microscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 643, p. 26–37, 2009.
- [302] RAHMAN, M. M. Reusable and mediator-free cholesterol biosensor based on cholesterol oxidase immobilized onto TGA-SAM modified smart bio-chips. **PLoS ONE**, v. 9, p. 1–8, 2014.
- [303] CAMPOS, R.; FERAPONTOVA, E. E. Electrochemistry of weakly adsorbed species: Voltammetric analysis of electron transfer between gold electrodes and Ru hexamine electrostatically interacting with DNA duplexes. **Electrochimica Acta**, v. 126, p. 151–157, 2014.
- [304] STEEL, A. B.; HERNE, T. M.; TARLOV, M. J. Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 4670–4677, 1998.
- [305] GARCÍA-MENDIOLA, T. et al. Nanostructured rough gold electrodes as platforms to enhance the sensitivity of electrochemical genosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 788, p. 141–147, 2013.
- [306] SCHEBELISKI, A. H. et al. Preparation and characterization of a carbon nanotube-based ceramic electrode and its potential application at detecting sulfonamide drugs. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 48, p. 471–485, 2018.
- [307] BARISCI, J. N.; WALLACE, G. G.; BAUGHMAN, R. H. Electrochemical characterization of single-walled carbon nanotube electrodes. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 147, p. 4580, 2002.
- [308] YU, H. Z. et al. Voltammetric procedure for examining DNA-modified surfaces: quantitation, cationic binding activity, and electron-transfer kinetics. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 3902–3907, 2003.
- [309] ROSE, D. M. et al. ^{25}Mg NMR in DNA solutions: Dominance of site binding effects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p. 6289–6292, 1980.
- [310] BIN, X.; SARGENT, E. H.; KELLEY, S. O. Nanostructuring of sensors determines the efficiency of biomolecular capture. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 5928–5931, 2010.
- [311] MEUNIER-PREST, R. et al. Electrochemical probe for the monitoring of DNA-protein interactions. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 2598–2602, 2010.
- [312] YANG, Y. et al. Enhanced charge transfer by gold nanoparticle at DNA modified electrode and its application to label-free DNA detection. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, p. 7579–7584, 2014.
- [313] PANDEY, P.; HASNAIN, S.; AHMAD, S. Protein-DNA Interactions. **Encyclopedia of**

Bioinformatics and Computational Biology, v. 2, p. 142–154, 2019.

[314] WANG, W.; LIU, J.; ZHOU, X. Identification of single-stranded and double-stranded dna binding proteins based on protein structure. **BMC Bioinformatics**, v. 15, p. S4, 2014.

[315] ROHS, R. et al. The role of DNA shape in protein-DNA recognition. **Nature**, v. 461, p. 1248–1253, 2009.

[316] WATROBA, M.; SZUKIEWICZ, D. The role of sirtuins in aging and age-related diseases. **Advances in Medical Sciences**, v. 61, p. 52–62, 2016.

[317] JEŚKO, H. et al. Sirtuins and Their Roles in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders. **Neurochemical Research**, v. 42, p. 876–890, 2017.

[318] LUCKE-WOLD, B. et al. Role of Tau Acetylation in Alzheimer's Disease and Chronic Traumatic Encephalopathy: The Way Forward for Successful Treatment. **Journal of Neurology and Neurosurgery**, v. 4, p. 1–7, 2017.

[319] MIN, S. et al. SIRT1 deacetylates Tau and reduces pathogenic Tau spread in a mouse model of tauopathy. **The Journal of Neuroscience**, v. 38, p. 3680–3688, 2018.

[320] ROHS, R. et al. Origins of Specificity in Protein-DNA Recognition. **Annual Review of Biochemistry**, v. 79, n. 1, p. 233–269, 2010.

[321] MATTHEWS, B. W. et al. Structure of the DNA-binding region of lac repressor inferred from its homology with cro repressor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, p. 1428–1432, 1982.

[322] SCHAEFER, G. B.; THOMPSON JR, J. N. **Medical genetics: an integrated approach**. New York: McGraw-Hill Education, 2014.

[323] ZHANG, Y.; ZHAO, J. TFEB participates in the A β -induced pathogenesis of Alzheimer's disease by regulating the autophagy-lysosome pathway. **DNA and Cell Biology**, v. 34, p. 661–668, 2015.

[324] XIAO, Q. et al. Neuronal-targeted TFEB accelerates lysosomal degradation of APP, reducing A β generation and amyloid plaque pathogenesis. **Journal of Neuroscience**, v. 35, p. 12137–12151, 2015.